

病理形態学への超高压電子顕微鏡の応用 —電顕トモグラフィーによる3次元解析—

Utilization of High Voltage Electron Microscopy (HVEM) in Histopathology —3 Dimensional Analysis by Electron Tomography

伊 藤 浩 行
Hiroyuki Ito

^a近畿大学医学部病理学教室

要 旨 超高压電顕は、厚い切片の観察を可能にしたことから、医学・生物学における形態学的研究に新たな展開をもたらした。その例として本稿では脳卒中モデルラットを用いた高血圧による脳浮腫の形態学的研究を紹介する。通常の透過型電顕では神経の変性や血管透過性の亢進を示す所見は認められるものの、その原因を明らかにすることは不可能であったが、超高压電顕により厚い試料を観察し、トモグラフィーを作成して3次元の解析を行うことにより、神経細胞における dendrite spine の変化や、微小血管における好中球の接着の様相が明らかとなった。超高压電顕による観察およびコンピュータを用いた立体像の構築さらにトモグラフィーの作成による解析は、従来の光顕と電顕のイメージギャップを埋めるだけではなく、形態と機能を結びつける手段としても極めて有用であり、今後病理形態学への応用が期待される。

キーワード：高血圧、脳浮腫、神経障害、電子線トモグラフィー

1. はじめに

病理学とは「疾病の本態とその原因を究明する科学」であり、大きく人体病理学と実験病理学に分けられている。ヒトあるいは動物における疾病の大半は器質的疾患であり、何らかの形態的变化を伴っている。従って、病院における診断業務を中心とする人体病理学は元より、モデル動物を用いた実験的研究においても、病理学的研究のスタートは疾患における形態異常の把握であり、治療方法の開発等の研究のゴールもまた形態学上の確認である。分子生物学的技法が高度に発展した今日においても、病理学的研究は「形態に始まり形態に終わる」と言っても過言ではない。従って「顕微鏡」は病理学における必須のツールであり、顕微鏡なくして病理学は成立しない。

2. 組織学的検索方法の進歩

病理組織学的検索はフォルマリン固定標本を薄切片し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色をした後、通常の光学顕微鏡で観察することが、現在でも基本である。病理組織診断における診断基準や分類はもっぱら HE 染色に基づいて決められている。しかし、近年の免疫学の飛躍的な発展により形

態学においても免疫組織化学的手法が導入され、病理組織診断の精度は著しく向上した。現在では免疫染色は病理診断に不可欠の手法となっている。しかし、光学顕微鏡による観察では分解能に限界があり、細胞や組織の微細構造の変化を捉えることは不可能である。従来より、電子顕微鏡による観察が併用されており、ある種の疾患では電子顕微鏡による所見が診断の決め手になり、保険適用が認められている。しかし、電子顕微鏡による観察は、古くから「イカとスルメ」にたとえられるように生きている状態とは著しくかけ離れていることや、また「針の穴から天井を見る」と言われるように観察範囲が限られていることを常に認識することが肝要である。近年、生きた細胞・組織を観察したいという強い願望・要求が強まり、共焦点顕微鏡を始めとする様々なツールが開発されてきた。すなわち「生きた細胞を経時的に観察する」こと、すなわち時間の要素を加えることにより、新しい病理形態学の展開が始まっている(詳しくは「病理と臨床」Vol. 25, No. 6, 2007 特集：形態学の進歩「時空間病理」を参照されたし)。

一方、電子顕微鏡の分野においても様々な改良・開発が進められており、近年本特集に取り上げられた「超高压電子顕微鏡」が開発された。本装置は2-3 MVの加速電圧を得ることができるため、従来の透過型電顕のように超薄切片を作成する必要がなく、理論的には5 μmの切片を観察することも可能とされている。すなわち、広い範囲で且つ奥行きのある観察が出来るばかりでなく、電子線トモグラフィーを作成することにより従来の顕微鏡では困難であった病理形態学にお

^a 〒589-8511 大阪狭山市大野東377-2
TEL: 072-366-0221
E-mail: hiroyuki@med.kindai.ac.jp
2008年8月12日受付

ける3次元解析が可能となり、格段に多くの情報を得ることができるようになった(電子線トモグラフィーに関しては「顕微鏡」Vol. 39, No. 1, 2004 特集:「電子線トモグラフィー」を参照されたし)。

本稿では、超高压電顕を用いた病理形態学的検索の例として、ラットにおける高血圧性脳病変の検索結果を紹介する。

3. 超高压電顕による脳微小血管障害の検索

脳微小血管障害による脳浮腫の発生は脳出血や脳軟化症などの脳血管障害のみならず、脳腫瘍、脳外傷などにおいても必発する病変であり、その程度が患者の予後に大きく影響することが知られている。従って、微小血管障害とそれによる神経細胞障害の病態を解明することは、これらの疾患における症状の改善や治療にとって不可欠の課題であるが、このような病態の発生機序に関する研究を人体を用いて遂行することには多くの制約があり、代わって様々なモデル動物が用いられてきた。それらの中で岡本ら¹⁾により分離生成された脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) は、全例が重症の高血圧を発症し、その結果そのほとんどが脳血管障害を発症して死亡するもので、人の本態性高血圧および高血圧性脳血管障害の唯一の自然発症モデルとして、世界各国で賞用されている。SHRSPでは全身の諸臓器に典型的な高血圧性血管病変が見られるが、中でも脳血管障害(脳出血、脳軟化)はこのモデル動物のみに見られる特徴的な病変であり、岡本および共同研究者により、このラットの分離生成過程当初より多くの形態学的検索が行われてきた²⁾。その結果、SHRSPの大脳皮質では微小血管障害による透過性の亢進が見られることが明らかにされ、脳浮腫が神経細胞の変性壊死に重要な役割を果たしていることが示されている³⁻⁵⁾。しかし、これらの検索はいずれも二次元における解析であり、病変の本態・あるいは成立過程の詳細は不明のまま残されている。そこで、超高压電顕を用いて厚い切片の観察を行うことにより、3次元での解析を試みた。

3.1 試料の作成と超高压電顕による観察方法

生後20週齢の雄性SHRSPをネブタール麻酔下で灌流し、大脳を分離した。定法に従ってグルタルアルデヒド・オスミウム固定を行ってエポキシに包埋し、電顕用試料を作成した。病変部における神経線維の分布を検索するためにはホルマリン固定標本を用いてBodian染色を行った後、再固定を行って電顕用試料を作成した。光顕用に1 μ mの切片を作成し、トルイジンブルー染色を施行し病変を観察した後、通常の透過電顕用の超薄切片、および超高压電顕用の2 μ mの厚さの切片をREICHERT NISSEI ULTRACUT Sを用いて作成した。超薄切片はウラン・鉛染色後、透過型電子顕微鏡(日立H7100)を用いて、また超高压電顕用切片は鉛染色後金粒子を添加し、超高压透過型電子顕微鏡(日立H-3000, 大阪大学超高压電子顕微鏡センター)を用いて加速電圧2000 kVで観察した。さらに超高压電顕内で試料を傾斜し、-70度から+70度まで観察角度を2度ずつ変えて70枚の写

真をCCDカメラにより撮影した。これらの透過電顕像をコンピュータ内に取り込み、位置補正を加えた上で連続像として観察するとともに、コロラド大学Boulder Laboratoryによって開発された解析ソフトIMOD package⁶⁾を用いて3次元再構築画像を作成した。

3.2 結果

図1aは大脳皮質のBodian染色光顕像で、浮腫性病変である。神経線維が黒色に染められているが、その分布は極めて疎となっており、且つ配列・走行共に著しく乱れている。このような部位を超高压電顕により観察すると、図1bに見られるように、神経細胞の形態は比較的よく保たれているものの、細胞内外の神経線維は極めて乏しく、且つ不連続で細片状を呈しており、神経のネットワークは明らかに破綻している。また、図1cは微小血管の超高压電顕像を示しているが、厚さ2 μ mの切片であるにもかかわらず周囲には組織成分が見られず、血管透過性が著しく亢進していることを示している。このような血管では神経の分布が極めて乏しいのが特徴である。

図2は図1bに相当する浮腫性病変部における神経細胞の解析結果を示している。図2aは超高压電顕による透過電顕像である。大きな核と豊かな胞体を有する神経細胞で、dendriteの先端はfreeであり、シナプスの断裂が生じている。またdendriteには枝別れが見られ、1本の主軸から細い突起が出ており、この細い突起には多数の球状の構造物が認められた。この構造の詳細を明らかにするために角度を変えて70枚の写真を撮影した。図3bはその一部を示している。dendriteに見られる微小突起は先端近くに多く、これらの球状の構造物は明らかにdendriteと連続していることが確認された。図3cは3次元立体像の断層像で、250枚中の4枚を示している。これらの解析から、球状の異常構造の本態はdendrite spineの水腫変性によるものであることが確認された。このようなdendrite spineの部位では隣接する神経線維との間にシナプス構造は認められなかった。

図3は図1cに相当する微小血管の病態を示している。図3aは大脳皮質微小血管の透過電顕像である。血管腔には内皮細胞に接して好中球が認められる。しかし、この所見では単なる接触かあるいはactiveな接着であるかは不明である。図3bは超高压電顕内で傾斜をかけて撮影された透過電顕像である。角度を変えて観察すると、好中球表面には多数の突起が認められる。図3cは再構築された立体像の断層像(140枚)の一部を示している。連続写真あるいは動画を作成することにより、好中球は細胞表面の微小突起(偽足)により内皮細胞に蜜に接着していることが観察された。

3.3 考察

今回の検索で明らかにされた神経細胞における最も特徴的な所見はdendrite spineの腫大・崩壊であった。神経細胞における浮腫性の変化はすでに多くの研究者によって報告されているが^{7,8)}、SHRSPのdendrite spineの変化に関しては、全く報告されていない。よく知られているように、dendrite

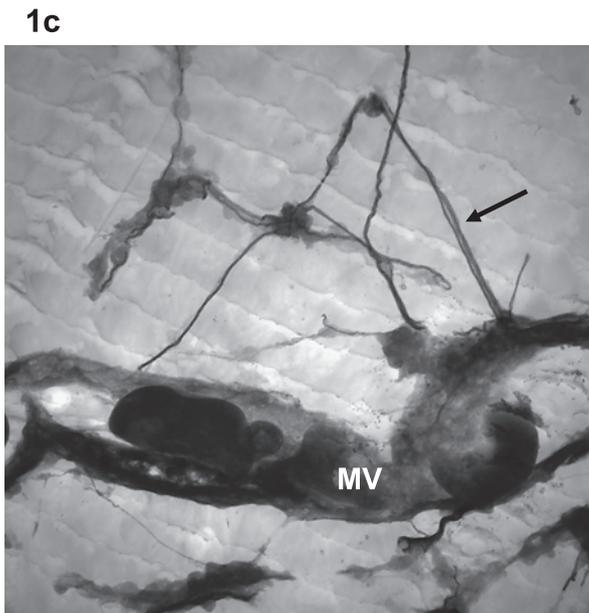
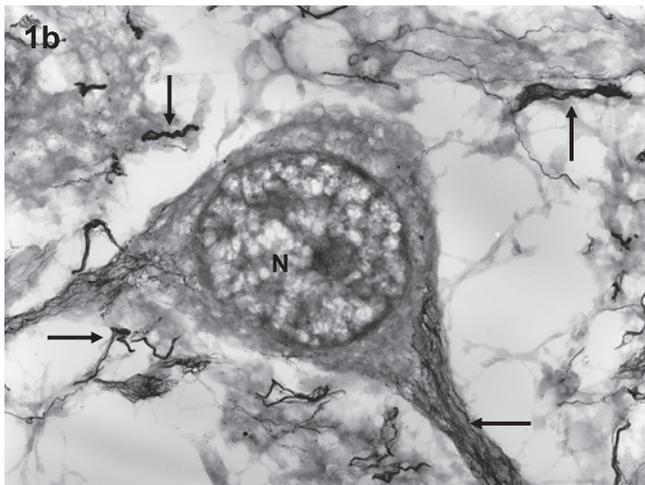
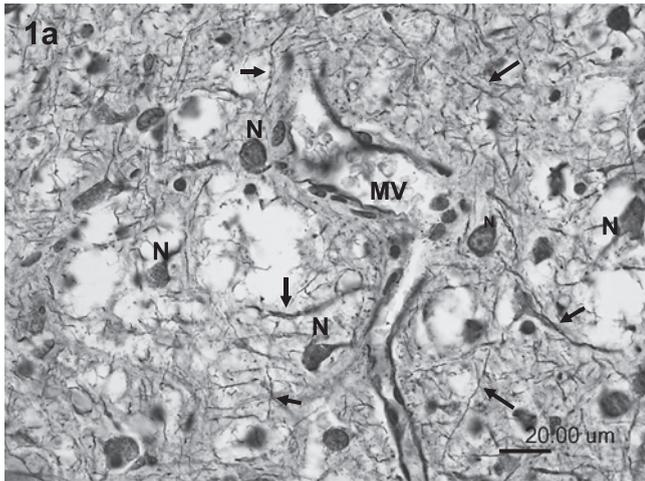


図1 SHRSPにおける大脳皮質の組織所見
 a SHRSPの浮腫性病変(Bodian染色)
 N: 神経細胞 MV: 微小血管 arrows: 神経線維
 b SHRSPの神経細胞(Bodian染色後 超高压電顕像, × 3,000)
 N: 神経細胞 arrows: 神経線維
 c SHRSPの微小血管(Bodian染色後 超高压電顕像, × 3,000)
 MV: 微小血管 arrows: nerve fiber

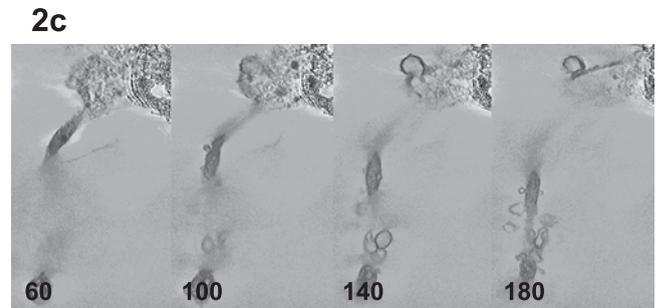
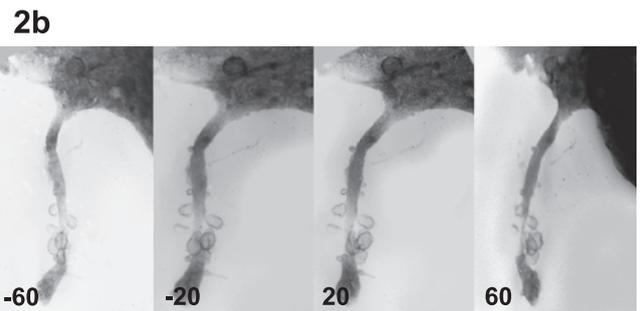
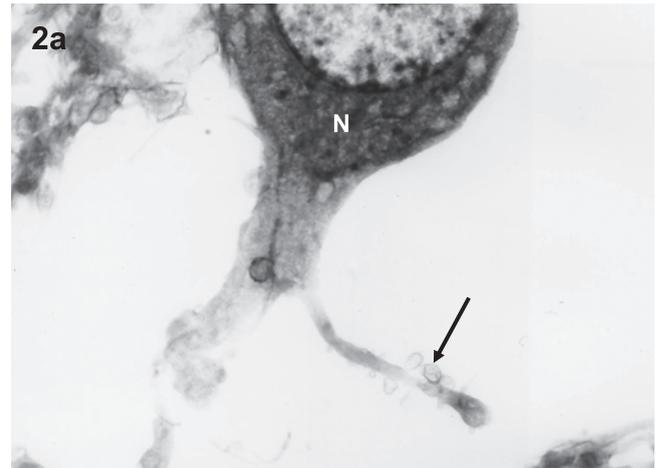


図2 SHRSPにおける神経細胞の検索
 a 超高压電顕透過像 矢印: 嚢泡状構造 (× 5,000)
 b 樹状突起の傾斜像 (数字は傾斜角度)
 c 樹状突起の3次元断層像 (数字は250枚中の番号)

spine は興奮性ニューロンのシナプスを形成しており、神経の機能に極めて重要な役割を果たしており⁹⁾、加齢やある種の病的状態において数や密度あるいは大きさが変化することが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。Martone ら¹³⁾は超高压電顕を用いた3次元トモグラフィーにより、ラット虚血再灌流モデルを用いて海馬の神経細胞の検索を行い、postsynaptic dendrite がより不整になり、配列も粗になっていることを明らかにしている。今回の3Dトモグラフィーにより、従来の検索では不明であったいわゆる“かくされた” dendrite spine の存在が明らかとなり、dendrite の全周にわたって存在する spine は一様に数が減少し、且つ残存するものには水腫状腫大が認められた。また本来存在するはずのシナプスも全く認められず、神経細胞は間質液中に浮遊した状態で認められた。しかし、核や細胞質の構造は比較的良く保たれており、少なくとも

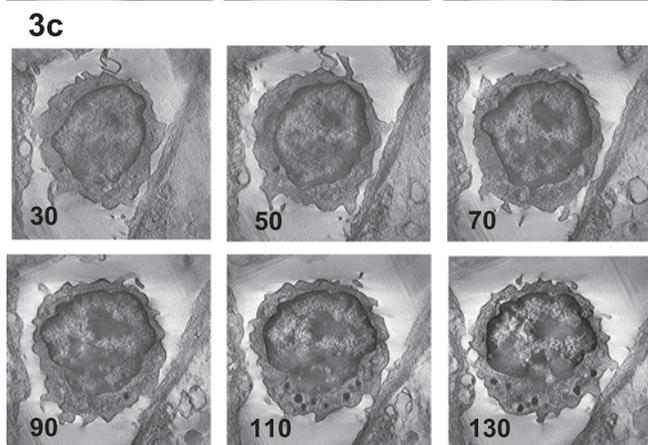
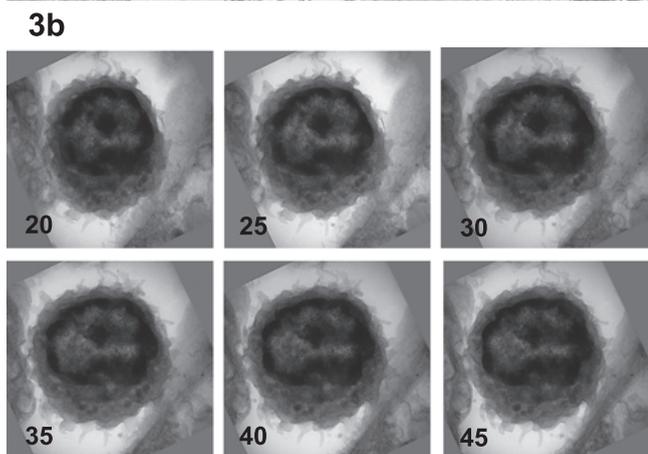
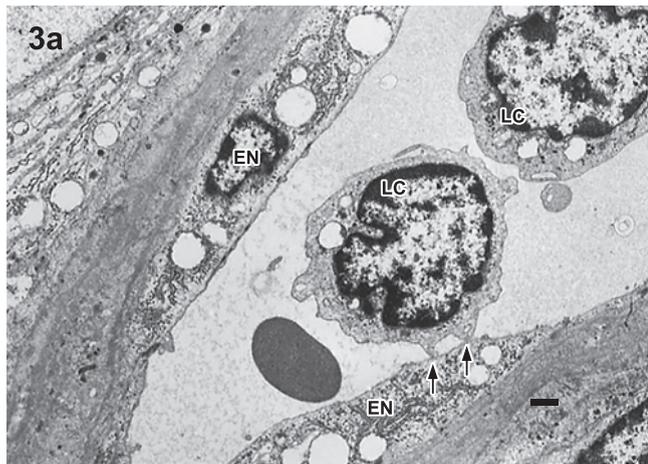


図3 微小血管における好中球の接着

- a 透過電顕像 (Bar 1 μ m)
 LC : 好中球 EN : 内皮細胞 arrows : 接着部位
 b 超高圧電顕傾斜像 (数字は傾斜角度, $\times 6,000$)
 c 3次元断層像 (数字は140枚中の番号)

も細胞死を示す所見は認められなかった。すなわち、これらの所見は、脳浮腫病巣では神経細胞の変性壊死に先行して dendrite spine の腫大・崩壊が生じ、シナプスが破壊されることを示しており、病変発生の比較的早期に機能障害が生じていることを示している。

4. おわりに

超高圧電子顕微鏡の開発により、従来全く不可能であった厚い切片の観察が可能となり、生物試料を立体的に観察することができるようになった。さらに試料を傾斜させることにより、微細構造を異なった角度から観察することも可能になった。このようにして得られた2次元画像を逆投影することにより3次元像を再構築し、この断層像を作成することが出来る。このようにして得られた電子線トモグラフィーは従来の光学顕微鏡と電子顕微鏡の間の image gap を埋めるものであり、形態学的観察に多くの新しい知見をもたらす画期的な方法であることが証明されている^{14,15)}。今後、医学・生物学分野への幅広い応用により、より詳細な知見が得られるものと期待される。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省ナノテクノロジー総合支援プロジェクトの支援を受けて実施されました。本研究の遂行に当たり、多大のご指導・ご協力をいただいた大阪大学超高圧電子顕微鏡センター 鷹岡昭夫教授、的場恭子氏、長谷川紀昭氏に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Okamoto, K., Yamori, Y. and Nagaoka, A.: *Circ. Res. [Supple 1]*, 34/35, 143-153 (1974)
- 2) Okamoto, K.: in Parvez, H. and Parvez, S. (Eds.), *Advances in Experimental Medicine*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1980, p. 169-198
- 3) Hazama, F., Amano, S., Haebara, H. and Okamoto, K.: *Acta Pathol. Jpn.*, 25, 565-574 (1975)
- 4) Ogata, J., Fujishima, M., Tamaki, K., Nakatomi, Y., Ishitsuka, T. and Omae, T.: *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 54, 183-188 (1981)
- 5) Fredriksson, K., Nordborg, C., Kalimo, H., Olsson, Y. and Johansson, B.B.: *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 75, 241-252 (1988)
- 6) Kremer, J.R., Mastrorarde, D.N. and McIntosh, J.R.: *J. Struct. Biol.*, 116, 71-76 (1996)
- 7) Amenta, F., Strocchim P. and Sabbatini, M.: *J. Hypertens. Suppl.*, 14, S29-S35 (1996)
- 8) Tagami, M., Yamagata, K., Ikeda, K., Nara, Y., Fujino, H., Kubota, A., Numano, F. and Yamori, Y.: *Lab. Invest.*, 78, 1415-1429 (1998)
- 9) Eilers, J. and Konnerth, A.: *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7, 85-90 (1997)
- 10) Belichenko, P.V. and Dahlstrom, A.: *J. Neurosci. Methods*, 57, 55-61 (1995)
- 11) Johansson, B.B. and Belichenko, P.V.: *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 22, 89-96 (2002)
- 12) Duan, H., Wearne, S.L., Rocher, A.B., Macedo, A., Morrison, J.H. and Hof, P.R.: *Cereb. Cortex*, 13, 950-961 (2003)
- 13) Martone, M.E., Jones, Y.Z., Young, S.J., Ellisman, M.H., Zivin, J.A. and Hu, B.R.: *J. Neurosci.*, 19, 1988-1997 (1999)
- 14) Perkins, G.A., Renken, C.W., Song, J.Y., Frey, T.G., Young, S.J., Lamont, S., Martone, M.E., Lindsey, S. and Ellisman, M.H.: *J. Struct. Biol.*, 120, 219-227 (1997)
- 15) Martone, M.E., Gupta, A., Wong, M., Qian, X., Sosinsky, G., Ludascher, B. and Ellisman, M.H.: *J. Struct. Biol.*, 138, 145-155 (2002)