

光子・電子ハイブリッド顕微鏡開発 —「FL-SEM」による観察—

A Fluorescence Scanning Electron Microscope

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,
久富 智朗^h, 納富 昭司^h, 中村桂一郎ⁱ

Takaaki Kanemaru, Kazuho Hirata, Shin-ichi Takasu,
Shin-ichiro Isobe, Keiji Mizuki, Shuntaro Mataka,
Toshio Hisatomi, Syouji Noutomi and Kei-ichiro Nakamura

^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九州大学大学院医学研究院眼科学分野

ⁱ久留米大学医学部解剖学講座

要 旨 生体の機能と形態の関連を裏付ける可能性を秘めた蛍光組織細胞化学染色標本において、同時・同軸での超微形態観察が実現できれば、微小領域の形態と機能の統合的解析が可能となる。今回、蛍光光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡を組み合わせたハイブリッド型顕微鏡を開発した。本稿では「FL-SEM」と命名した本装置の概要を解説し、撮影された画像を紹介する。また本装置による観察に有利な新規蛍光物質「Fluolid」について言及する。

キーワード：ハイブリッド、走査型電子顕微鏡、蛍光顕微鏡、有機EL蛍光、多角的観察顕微鏡

1. はじめに

組織や細胞が持つ特有の構造や機能を蛍光色素プローブにてさまざまに標識された蛍光顕微鏡画像からは、それらの由来や機能を類推をも交えながら考察することが出来る。残念なことに、たとえ共焦点レーザー顕微鏡であれ光顕レベルの観察では対象の超微形態までは判断しかねる。一方、電子顕微鏡画像ではその高精細画像により超微形態が同定され、細

胞の断片と思われる部分まで詳細な観察が可能であるが、同種の細胞に機能異常がある場合でも微小領域の観察ではその判読は難しいことが多い。蛍光顕微鏡画像と電顕画像を個別に撮影し、それらを重ね合わせ合成する解析も古くから行われてきた。しかしながら、光学特性が異なる顕微装置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。金コロイド等を用いた電顕組織細胞化学法もあるが、試料作製・観察・撮影には多大な時間と労力が必要である。Yamadaら¹⁾は、組織内の特定細胞の存在様式や機能、あるいはその障害を電子顕微鏡レベルの分解能で観察することの必要性を強調した。

我々は、ひとつの解決として蛍光顕微鏡 (FL-OM: fluorescence optical microscope) と走査型電子顕微鏡 (SEM: scanning electron microscope) をハイブリッド化した微細構造と機能標識の同軸観察を可能にする顕微鏡装置「FL-SEM」^{2~4)}を構築した。その応用実験により得られた像をここに紹介する。本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、今後様々な科学・産業分野での活用が期待される。

2. SEMへの蛍光光学系導入

SEM本体に導入した蛍光光学系の構築には可動式光学顕微鏡を利用した。この装置は中央部に電子線通過用ホールのある屈折型対物レンズを備えており、SEM本体側面より真空を破ることなく先端光学部の出し入れができる。この装置へ光ファイバー照射タイプの蛍光励起用水銀ランプ、蛍光用励起/吸収フィルター、Cマウントカメラが取り付け可能な三眼鏡筒、光顕用カラーデジタルカメラを装着し、落射蛍光顕微鏡撮影装置とした。この蛍光顕微鏡による観察および撮影は可能であったが、可動部の装着位置再現性が不安定であるために光学系中心軸と電子線中心軸が位置ズレを起こし、表面形状が複雑な生物試料での詳細な解析は難しかった。

次に、試料表面確認用の対物レンズとして光子/電子軸が一致した固定タイプの光学系を持ち、位置ズレが少ない設計のEPMA (Electron Probe MicroAnalyzer) を導入し、本体 (JXA-8600M, JEOL) の大気部光学系を落射型蛍光顕微鏡へと変更した。その際、将来のラマン分光等の導入を視野に入れ蛍光光源をレーザーに変更すると共に、EPMA内に固定されている作動距離が長いカセグレン型対物レンズに対しレーザー光の特性に最適化した光学系を新たに構築した。

最終的に複数のレーザー光源 (昭和オプトロニクス)、スライド式フィルター (Semrock, Inc)、高感度冷却型モノクロデジタルカメラ (ニコン)、蛍光画像とSEM画像の取込・画像合成用ソフト (NIS Element; ニコン, semAfore; JEOL, Photoshop; Adobe) をインストールしたパソコン (OPTIPLEX 740; DELL) を付属させたものが、現在の「FL-SEM」プロトタイプ機である (図1)。

¹⁾ 〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1
TEL: 092-642-5740; FAX: 092-642-5743
E-mail: kanemaru@mccore.med.kyushu-u.ac.jp
2010年11月30日受付

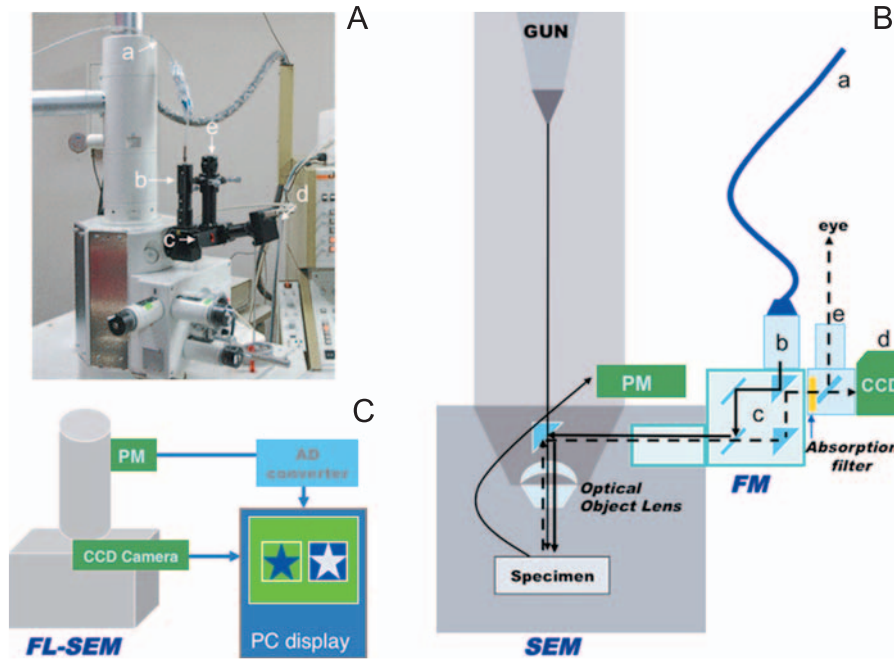
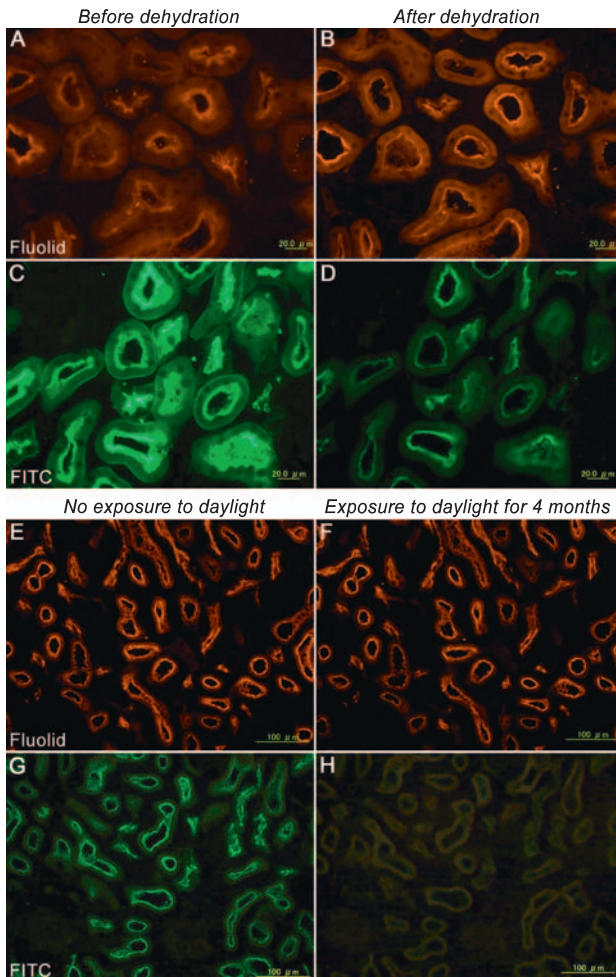


図1 A: FL-SEMの外観図 B: 内部構造断面図 C: 顕微鏡システムデータの流れ図
a: レーザー光源用光ファイバー 光源: 405 nm/473 nm/532 nm
b: レーザー誘導レンズ c: 光路切換プリズム
d: CCDカメラ (高感度モノクロ電子冷却タイプ) e: 接眼レンズ



3. 新規蛍光物質(Fluolid:オキサジアゾロピリジン誘導体)⁵⁾

Fluolidは、有機EL用蛍光物質として開発された色素シリーズでありその特徴として ①脱水や乾燥状態でも高い量子収率を示すこと、②熱・光・pH安定性を有すること、③励起波長と吸収波長の差 (Stokes shift 約 150 nm) が広いことが挙げられる。また③の効果により UV 領域一波長励起による複数色同時観察が可能である。

本装置の特徴である SEM・蛍光の2種類の波長源を用いた観察では、電子線とレーザー光のどちらにも耐性がある蛍光物質が必要である。本研究では、この Fluolid-W Orange (橙色) と従来から蛍光標識としてよく用いられている FITC (緑色) の強度と安定性を比較検討した。各蛍光試薬の脱水前後および染色後4ヶ月間に渡る日光暴露後の輝度比較実験(図2)により Fluolid の優位性が確認された。

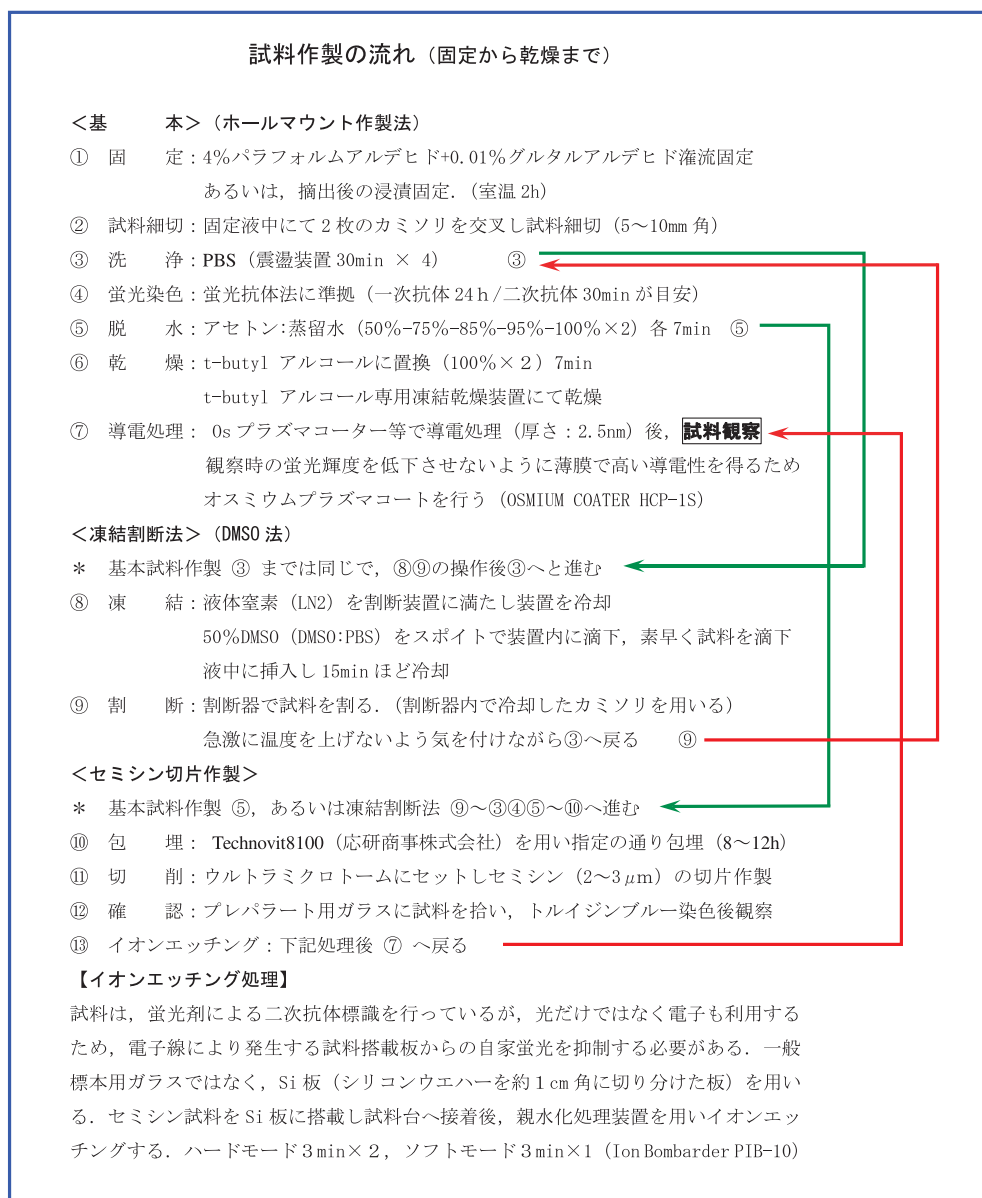
4. 試料作製法

蛍光と SEM 試料の同時観察に適する試料作製法を検討し

図2

A: Fluolid-Or 脱水前 B: Fluolid-Or 脱水後
C: FITC 脱水前 D: FITC 脱水後
* 脱水後 Fluolid の輝度が高くなったが一方 FITC は輝度が下がった。
E: Fluolid-Or 遮光時 F: Fluolid-Or 4ヶ月間太陽光下で暴露
G: FITC 遮光時 H: FITC 4ヶ月間太陽光下で暴露
* 4ヶ月間太陽光下で暴露後 Fluolid はほとんど蛍光輝度に変化が認められないが、FITC では蛍光消失した。(マウス尿細管刷子縁)
文献3) より Elsevier の許可を得て転載。

表1 試料作製フローチャート



た。「FL-SEM」用の試料作製法として, ① ホールマウント法 ② DMSO 凍結割断法 ③ イオンエッチング法^{6,7)}を用い, その適正化を試みた (表 1)。

5. FL-SEM による観察

図 3 に示す画像は, ラット灌流固定後に横隔膜の一部をナイフで切り出し, 一次抗体として抗 Iba-1 抗体 (rabbit, WAKO 100 倍希釈), 二次抗体として Alexa-488 (rabbit, Molecular Probes 200 倍希釈) を用いて染色後観察したものである。SEM の写真では容易でなかったマクロファージの同定は, 免疫染色後の試料を用いた FL-SEM 画像により容易になり, 位置や大きさが即座に判断出来た⁸⁾。

図 4 では, マウス腎臓の尿細管を凍結割断法にて作製した例と, 2~3 μm 厚切片にイオンエッチングし観察した例

を示す。共にビオチン化 PNA レクチン (Vector 100 倍希釈) で染色した後⁹⁾, アビジン Fluolid-W Orange にて標識した。いずれの方法でも蛍光像と SEM 像を重ね合わせた画像から, 刷子縁の微細構造が蛍光標識されているのがわかる。

次に, 光学系の改良により多波長での蛍光観察が可能となった「FL-SEM」を用い, 蛍光顕微鏡で行われてきた動物モデル^{10,11)} の新生血管 (CNV: choroidal neovascularization) 観察を試みた。マウス眼球脈絡膜にレーザー照射し, CNV が成長した 2 週間後, 抗 Iba-1 抗体 (rabbit, WAKO 500 倍希釈) でマクロファージを, 抗 CD31 抗体 (rat, BD pharmigen 10 倍希釈) で CNV を標識し, 各々二次抗体として Alexa-488 (goat, Molecular Probes 500 倍希釈), Alexa-546 (goat, Molecular Probes 200 倍希釈) で二重染色した後, 網膜を剥離して CNV を露出させたホールマウント試料を観察した。

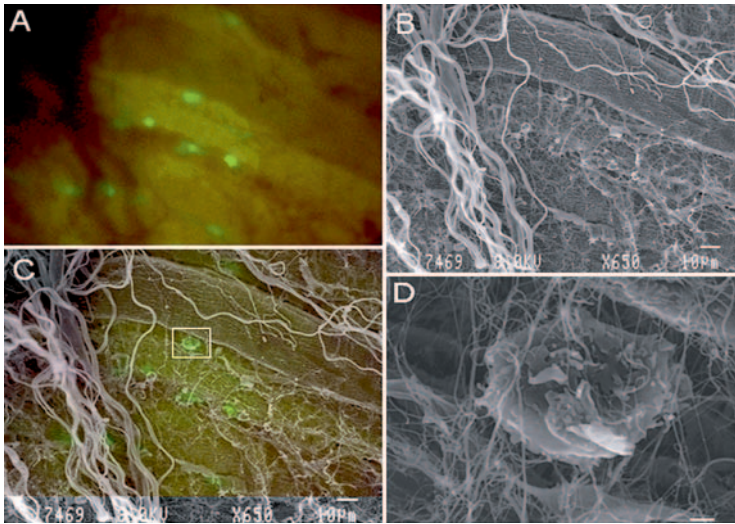


図3

A : FL-SEM で撮影したマクロファージ蛍光像。
 B : A と同じ位置を FL-SEM で撮影した SEM 像。
 C : A の蛍光像と B の SEM 像を重ね合わせた画像。
 D : 標識されたマクロファージの拡大像。
 (ラット横隔膜 Iba-1 標識 Alexa488)
 文献3) より Elsevier の許可を得て転載。

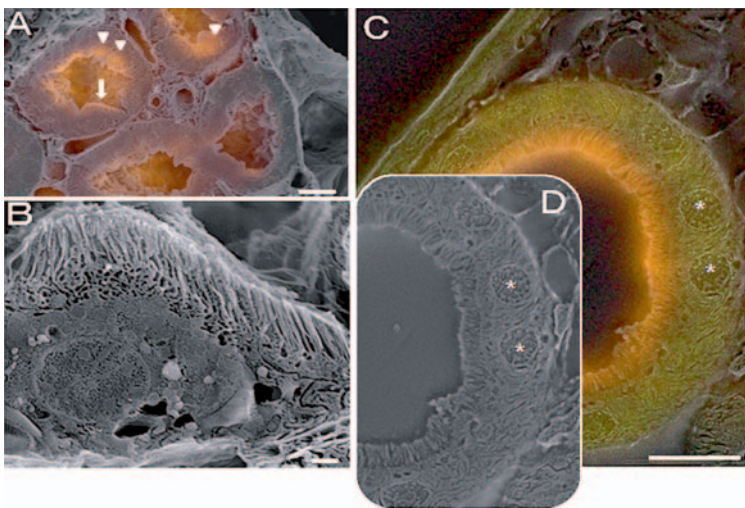


図4

A : Fluolid-Or にて刷子縁をバルク状態で蛍光標識後、凍結
 切断したマウス腎臓尿管。
 矢頭：非特異的染色 矢印：Fluolid 標識された刷子縁
 B : 矢印部位の拡大像。尿管細胞に刷子縁が観察される。
 C : 同じくバルク蛍光標識された尿管の切片(イオンエッチ
 ング)像。
 (*)印は尿管細胞核
 D : C と同じ位置の SEM 画像。(*)印は尿管細胞核
 Scale bar: (A): 10 μ m, (B): 1 μ m, and (C-D): 10 μ m。
 文献3) より Elsevier の許可を得て転載。

その結果、ホールマウント試料特有の立体的 SEM 観察により、マクロファージなどから放出された血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の影響が及ぶと考えられる範囲に CNV が形成されていることが示唆され、CNV とマクロファージの密接な関与が推測された。図5は、CNV 観察実験を通し光学顕微鏡では観ることのできない FL-SEM 画像を得ることが出来た例である。

6. 超高分解能顕微鏡の展開

形態観察の世界では、ここ2~3年の間に超高分解能蛍光顕微鏡が出現してきた。STED (ライカ) や PAL-M/HR-SIM (ツアイス), TIRF-SIM/3D-SIM (ニコン) などである。また、蛍光顕微鏡と SEM が組み合わせられた Correlative Microscope¹²⁾ 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いる点であり、驚くべき顕微鏡の進歩である。

一方、「FL-SEM」はハイブリッド系顕微鏡とはいえ、試料は真空中に入れる必要がある。本装置では、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、同軸の光子/電子線は試料に対し同じ方向から照射され、試料表面の同じ視角による観察ができる。

今後、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、GFP¹³⁾ 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を目指している。

7. おわりに

本開発研究を(社)日本顕微鏡学会学術講演会にて報告してきた中で、幾つかの指摘があった。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である。これらの改善は、既存技術で十分対応することができる。

現在、九州大学大学院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 Z 軸方向の高分解能化研究を行っている。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¹⁴⁾ など

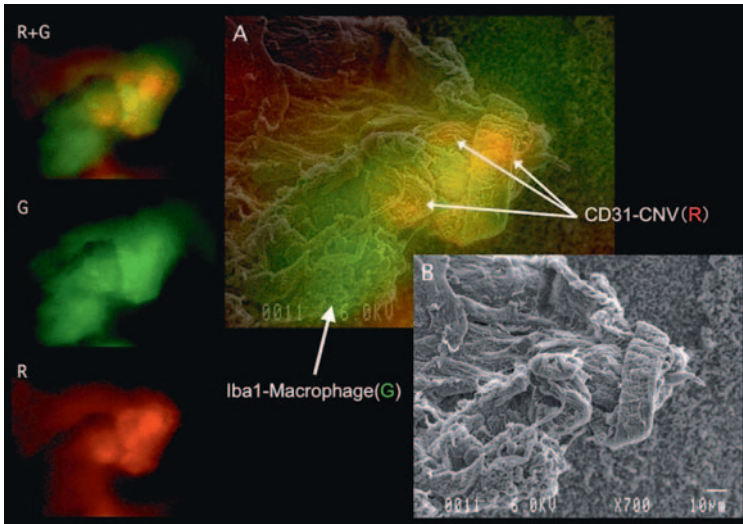


図5 FL-SEMで撮影した新生血管とマクロファージ
 A : SEM像と蛍光像の合成像 B : SEM画像
 R + G : 新生血管とマクロファージの蛍光像
 G : Iba-1 標識 Alexa488 画像 R : CD-31 標識 Alexa532 画像
 (マウス眼球：網膜剥離後の脈絡膜上)

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ことを期待している。

8. 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), 山下功介氏(ダイワボウレーヨン株式会社), 山口 登氏(九州大学), 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), 近藤照義博士(九州保健福祉大学), 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, Elsevier 出版社の関係者に感謝致します。

文 献

- 1) Yamada, M., Nishimura, M., Suzuki, T., Kawamata, S., Oho, E. and Kimura, T.: *J. Electron Microsc.*, 49, 503-507 (2000)
- 2) Kanemaru, T., Hirata, K., Takasu, S., Isobe, S., Mizuki, K., Mataka, S. and Nakamura, K.: *Materials Today*, 12 (Supplement 1), 18-23 (2010)
- 3) Kanemaru, T., Hirata, K., Takasu, S., Isobe, S., Mizuki, K., Mataka, S. and Nakamura, K.: *Ultramicroscopy*, 109, 344-349 (2009)
- 4) Kanemaru, T., Kondo, T., Takasu, S., Isobe, S., Mizuki, K. and Nakamura, K.: *J. Electr. Microsc. Technol. Med. Biol.*, 22, 38-39 (2008)
- 5) 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)
- 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., Takasu, S., Shigematu, M. and Nakamura, K.: Proceedings of the 16th International Microscopy Congress, 664 (2006)
- 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, 2928-2935 (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) Nishiyama, H., Suga, M., Ogura, T., Maruyama, Y., Koizumi, M., Mio, K., Kitamura, S. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, 69, 438-449 (2010)
- 13) 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)
- 14) Boyde, A., Lovicar, L. and Zamecnik, J.: *Eur. Cells Mater.*, 26, 33-38 (2005)