

## 低真空 SEM を用いた腎生検 パラフィン切片の迅速三次元解析法

### Rapid Three-Dimensional Analysis of Renal Biopsy Paraffin Sections by Low Vacuum SEM

稲賀すみれ, 亀家 俊夫, 中根 裕信,  
名黒 知徳, 海藤 俊行

Sumire Inaga, Toshio Kameie, Hironobu Nakane,  
Tomonori Naguro and Toshiyuki Kaidoh

鳥取大学医学部解剖学講座

**要 旨** 腎生検の電顕診断は、一般的には透過型電子顕微鏡を用いた腎組織の超薄切片像の観察によって行われているが、電顕試料の作製と画像の解析には専門的な技術や知識および時間を要する。私たちは、より簡便で迅速な電顕診断法として、最近様々な分野で広く活用されている卓上型の低真空走査型電子顕微鏡を用いることにより、通常の腎生検パラフィン切片で電顕レベルの三次元情報が得られる新しい解析法を開発したので紹介する。

キーワード：低真空 SEM, 腎生検パラフィン切片, 白金ブルー染色, PAM 染色, 電顕診断

#### 1. はじめに

電子顕微鏡が病理組織診断（電顕診断）に用いられる機会が近年増加してきており、疾患の鑑別診断や確定診断に重要な役割を果たしている。特に、腎臓疾患における「腎生検」の電顕診断は実施率が比較的高く、確定診断のみならず疾患の進行度や予後の判定などにおいても重要な意義をもっている<sup>1)</sup>。こうした電顕診断のほとんどは透過型電子顕微鏡法 (TEM) を用いて行われているが、ルーチンの病理検査として実施できる医療機関は限られており、電顕診断が必要な場合には専門の受託検査会社に依頼されることもある。また、電顕試料の作製と画像の解析には専門的な技術や知識および時間を要し、診断が確定するまでに数週間から数ヶ月かかることもあり、適切な治療を迅速に施すために、医療現場ではより簡便で迅速な電顕診断法が望まれている。

一方、走査型電子顕微鏡法 (SEM) は試料作製から観察まで TEM と比べれば短時間 (数日) で実施できるものの<sup>2~8)</sup>,

やはり専用の技術と装置が必要であり観察対象も主として表面形態に限られることなどから、一般の電顕診断にはほとんど用いられてこなかった。ところが、2005 年頃から、操作がとても簡単で高性能の卓上型の低真空走査型電子顕微鏡 (低真空 SEM) が各社で開発されはじめ、絶縁物でも煩雑な前処理や金属コーティングをせずに数十倍から数万倍まで任意の倍率で迅速に観察することが可能となり、様々な分野で幅広く活用されるようになった。そこで私達は、卓上型低真空 SEM の特長、特に「簡便性と迅速性」に着目して病理組織診断における応用法を検討し<sup>9)</sup>、その実用的な方法の一つとして開発したのが、本稿で紹介する「低真空 SEM を用いた腎生検パラフィン切片の迅速三次元解析法」<sup>10)</sup> である。本法は、従来の TEM による電顕診断法とは異なった観点 (試料作製の簡便性と迅速性、広範囲にわたる観察、三次元的な微細形態解析) から発案したもので、腎生検に際してどこの施設でも必ず作製される「光顕用パラフィン切片」を用いて「電顕レベルの三次元解析」を可能とする新しい電顕診断法である。もっとも、腎生検組織の病理診断に有用な所見を得るにはそれなりの前処理や工夫が必要で、本法の場合、組織の「染色法の組合せ」が特に重要なポイントであった。本稿では、低真空 SEM の特長、効果的な染色法、腎生検標本の観察法および得られた病理所見、また今後の展望について紹介する。

#### 2. 低真空 SEM の特長

低真空 SEM (low vacuum SEM: LVSEM) とは、試料室内の圧力を数十～数百 Pa に上げる (真空度を低くする) ことができる SEM のことで<sup>11,12)</sup>、VP-SEM (valuable pressure SEM)、N-SEM (natural SEM)、Wet-SEM などと同様の装置である。これらの装置では、油や水を含む試料や非導電性試料でも観察することが可能である。最近では二次電子を検出できる高分解能装置も開発されているが<sup>13)</sup>、一般的な低真空 SEM 観察には、残留ガス分子による散乱の影響を受けにくい反射電子 (backscattered electron: BSE) シグナルが用いられる (図 1)。しかし、反射電子は二次電子に比べてエネルギーが高いため、散乱される率は少ないものの分解能は低下する。そこで、高感度の反射電子検出器の採用や反射電子シグナル増強法 (重金属による染色法) によって解像度の良い三次元像を観察する方法が工夫されてきた<sup>14~16)</sup>。また、原子番号の大きい元素ほど放出される反射電子シグナルが増大する (原子番号効果) ため、組成の違いが明暗コントラストで表示され、異なる組成の分布状態が観察できるのも低真空 SEM のメリットである。

#### 3. 低真空 SEM 観察に効果的な白金ブルー染色と PAM 染色

一般的な低真空 SEM 観察では前処理や金属コーティングなどは不要ではあるが、生物試料を詳細に観察するのに欠かせないのが、効果的な重金属染色である。本稿で紹介する腎生検組織の観察には、白金ブルー (platinum-blue: Pt-blue)

### ●低真空観察法

試料室内を低真空にし、ガス分子の数を増やすと、電子ビームが試料室内のガス分子と衝突しやすくなります。この衝突の際、ガス分子  $M$  がイオン化され、+イオン  $+$  と電子  $e$  が生成します。このイオン  $+$  が試料表面に蓄積した電子  $-$  と結合して中和し、帯電を軽減することができます。

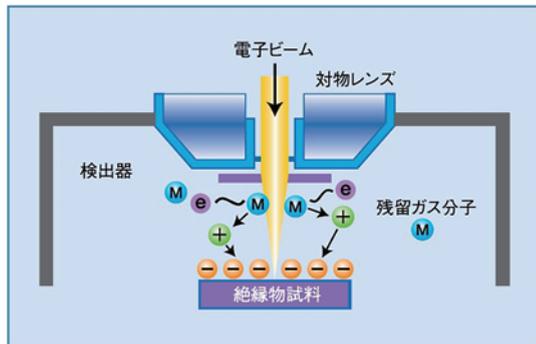


図1 低真空観察法 (画像提供: (株) 日立ハイテクノロジーズ).

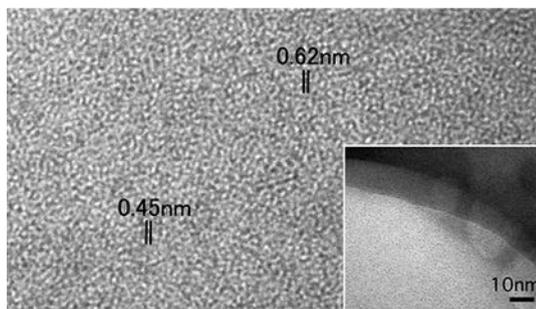


図2 マイクログリッドに載せた白金ブルー原液のTEM観察像。

染色と PAM (periodic acid silver-methenamine: 過ヨウ素酸メタナミン銀) 染色を用いる<sup>10)</sup>。白金ブルー染色は、1993年に Tanaka と Inagaki によって開発された生物試料のための反射電子シグナル増強法の一つで<sup>14)</sup>、あらかじめシスプラチンとチミジンから合成した濃青色で液状の錯体・白金ブルー  $[Pt_4(NH_3)_8(C_6H_{13}O_5)_4]^{+5}$  に少量のアンモニア溶液を加えて pH 9 に調整し、試料を 10 ~ 20 分程度浸漬するだけなので手順は非常に簡単であり、様々な生物試料の低真空 SEM 観察において極めて効果的である<sup>17)</sup>。以前は、白金ブルーそのものを使用者自身で作製しなければならない上、合成反応に約一週間かかるのが難点であったが<sup>18)</sup>、2008年に商品化(TIブルー: 日新 EM 株式会社)され、現在では誰でも容易に入手出来るようになった。図2は、白金ブルー原液をマイクログリッドに載せ、TEM (日立 H-7650) で直接観察したものである。ほぼ均一な極めて小さい粒子状の外観を呈し、凝集化も結晶化も認められず、酢酸ウラニルに代わる電子染色剤として TEM 試料にも使用できる<sup>19-22)</sup>。また、図3に示したのはラット舌の同一パラフィン切片を光顕と低真空 SEM で比較観察したものであるが、白金ブルーで染色された組織は青い色を呈するため、他の電子染色剤と違って光顕でも観察可能であると同時に、低真空 SEM 下においても白金ブルーの細胞

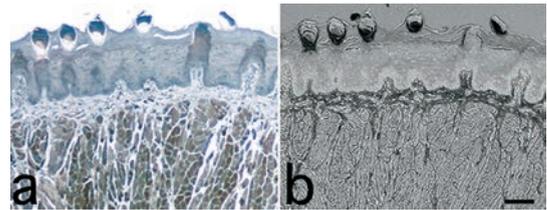


図3 白金ブルー染色したラット舌の同一パラフィン切片の光顕像 (a) と低真空 SEM 像 (b)。スケール: 100  $\mu m$ 。

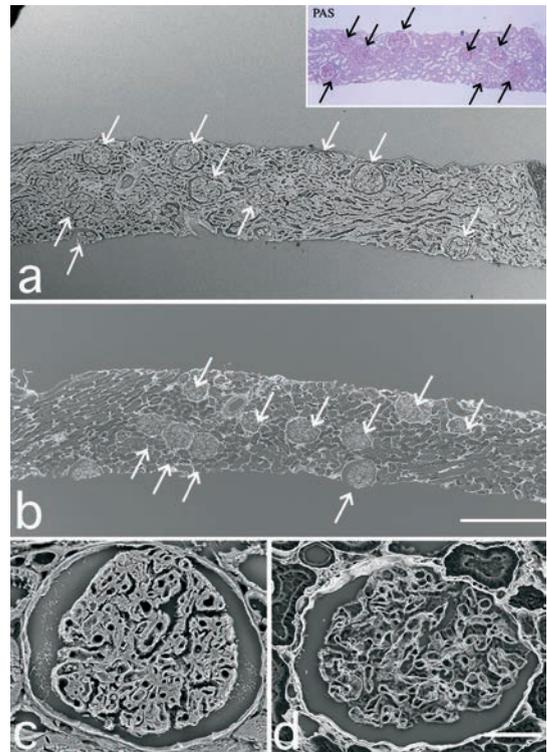


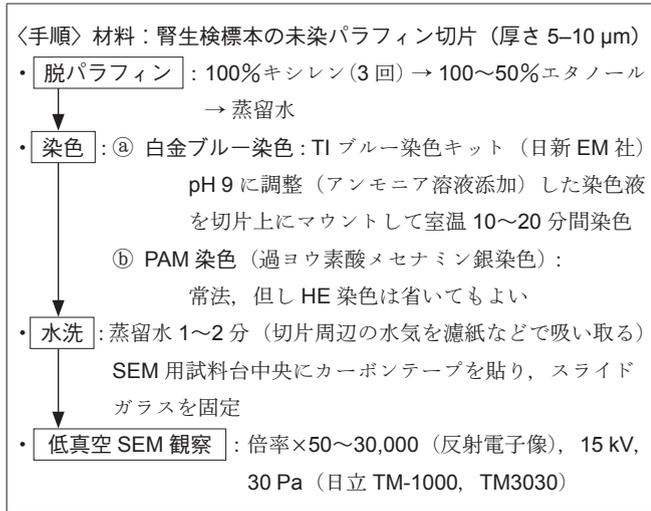
図4 腎生検パラフィン切片の低真空 SEM 像 (膜性腎症)。白金ブルー染色像 (a, c) と PAM 染色像 (b, d) の比較。染色陽性部位が互いに逆で、その明暗コントラストと形状により細胞や組織の識別が可能。(a)の挿入図は PAS 染色の光顕像。(a, b)の矢印: 個々の糸球体。(c, d)は、1個の糸球体の拡大像。スケール: 500  $\mu m$  (a, b), 50  $\mu m$  (c, d)。

組織特異性 (染色強度の差) により細胞や組織の識別が容易である<sup>23)</sup>。そこで、腎生検組織を白金ブルーで染色すると (図4a, c)、糸球体構成要素である足細胞や血管内皮細胞などの細胞成分はよく染まる (Pt 陽性) が基底膜や膠原線維などは染まりにくい (Pt 陰性) ため、低真空 SEM 下では明暗コントラストの差 (反射電子シグナル放出量の差) と形態によって個々の細胞や組織の識別が可能となる。一方、PAM 染色は腎生検組織の光顕標本にはルーチンに用いられる染色法で、含有する銀によって基底膜や膠原線維、メサングウム基質は光顕像では黒く染まる (PAM 陽性) が細胞などは染まらない (PAM 陰性)。すなわち、腎生検組織を PAM 染色すると (図4b, d)、低真空 SEM 下では、特に PAM 陽性の基底膜の形状が、表面の細胞など (PAM 陰性) を全く除去することなく明瞭に示され、白金ブルーとは全く逆の明暗コ

ントラストによって他の構造物との識別が可能である。従って、組織の連続切片を白金ブルーとPAMで別々に染色すれば相補的な観察が可能となるため、腎生検標本を低真空SEM像で効果的に評価できる。そして、この二つの方法で染色された標本では、それぞれの反射電子シグナル増強効果によって高い倍率で詳細に微細構造を観察することができるのである。

#### 4. 低真空SEMを用いた腎生検パラフィン切片の迅速三次元解析法と観察所見

##### 4.1 試料作製法および観察法



上記の手順に示すように、汎用サイズのスライドガラス（76 mm × 26 mm）に貼り付けた未染の腎生検パラフィン切片（厚さ 5 ~ 10 μm）を、通常の方法で脱パラフィンし、白金ブルーまたは PAM で染色した後水洗し、切片が濡れたままの状態ですライドガラスを低真空 SEM の試料室にセットして観察する。切片は、しばらくは含水状態であるが、観察しているうちに徐々に乾燥するため、約 10 分程度で真空乾燥状態となる。この乾燥による組織収縮の影響を評価するために、あらかじめ t-ブチルアルコール乾燥を行った切片と比較観察したところ（図 5）、糸球体の概形にはほとんど差が見られず、低真空乾燥によって微細形態が大きく損なわれることはなかった。これは、染色に用いた重金属（白金、銀）による組織の硬化に起因すると考えられた<sup>10)</sup>。組織の解析にあたっては、腎生検切片の全体像から各部分の拡大像まで任意の倍率（×50 ~ ×30,000）で観察を行う。前述したように、腎組織における白金ブルーと PAM の染色特性は相補的で、互いに異なった細胞や組織の明暗コントラスト像が描出されるため、両方の染色標本を観察することによって、病変部の三次元形態を迅速かつ詳細に解析できるのが低真空 SEM を用いる本法の大きな利点である。また、必要があれば、同一サンプルの顕微鏡像、蛍光像とも対比して観察することができる。

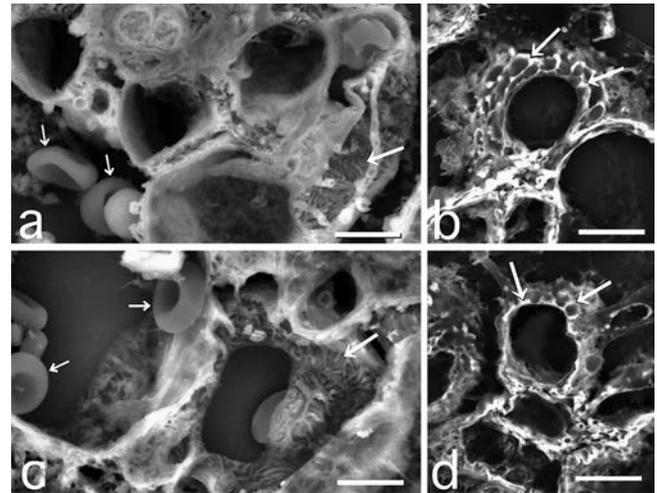


図 5 試料室に挿入する前に t-ブチルアルコール乾燥した切片 (a, b) と濡れたまま挿入し真空乾燥した切片 (c, d) の比較観察。(a, c) 白金ブルー染色像 (小矢印：赤血球, 大矢印：足突起) と (b, d) PAM 染色像 (小矢印：基底膜) のいずれの低真空 SEM 像においても形状の差はほとんど見られない。スケール：5 μm (a-d)。

##### 4.2 腎生検標本における糸球体の観察所見

本法では実際にどのような所見が得られるのか、すでに診断が確定した腎生検症例（微小変化型ネフローゼ症候群、IgA 腎症、膜性腎症）の低真空 SEM 像を供覧し、観察のポイントを解説する。これらの症例では、特に重要な糸球体の基本構造（足細胞と足突起、血管内皮細胞、基底膜、メサンギウム細胞、メサンギウム基質）に注目して形態観察を行った。低真空 SEM 下では、低倍（×50 ~ 60）で顕微鏡と同様に切片上の全ての糸球体（図 4a：矢印）を俯瞰的に観察することができる。そこで、個々の糸球体を ×600 ~ 1,000 に拡大して観察する（図 4c, d）。糸球体によって、主に表面像が観察される場合や（図 6）、断面像が観察される場合（図 7）があるので、病変や所見の解析に適した部位をさらに拡大して三次元的な形態解析を詳細に行う。この際、染色特性により異なる反射電子像（明暗コントラスト）が示されるので、組織像の違いに留意する必要がある。本法で得られた染色法による観察所見の違いと、それぞれの症例における糸球体基本構造の病理所見を図 6 ~ 8 に示した。

###### 〈白金ブルー染色標本〉（図 6a, b, 図 7, 図 8b）

各症例の表面像において、顕微鏡では観察困難な足細胞および足突起の微細構造が、立体像として広範囲に捉えられた（図 6）。症例によっては足突起の形状の変化（消失、癒合、微絨毛化）と同時に、基底膜の厚さの変化（菲薄、肥厚：計測も可）や蛇行、メサンギウムの増生などが断面像で認められた（図 7, 図 8b）。

###### 〈PAM 染色標本〉（図 8a, d, e）

膜性腎症に特徴的な PAM 陽性の基底膜の形状が、断面像だけでなく表面像としても上皮側と血管内皮側の両面から観察された。これは、基底膜から放出される反射電子シグナル

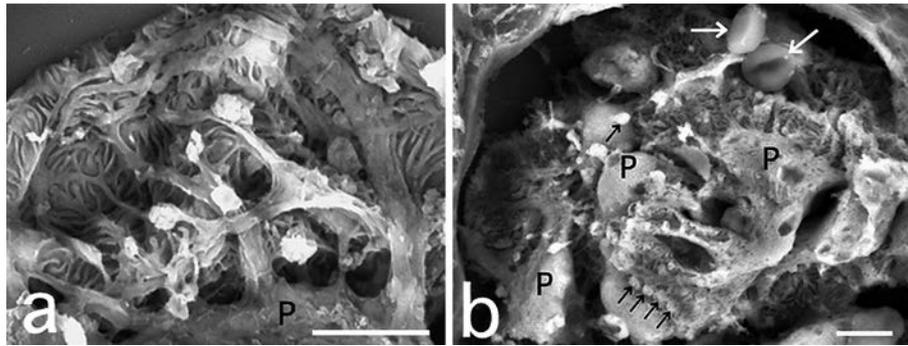


図6 糸球体表面の低真空 SEM 像 (白金ブルー染色). (a) 微小変型: 正常と思われる部分では, 足突起の特徴的な形状が明瞭に観察される (直接倍率  $\times 10,000$ ). (b) IgA 腎症: 足細胞の表面に顆粒状の構造物 (黒矢印) やボウマン腔にリークした赤血球 (白矢印) が認められる. P: 足細胞. スケール:  $5 \mu\text{m}$  (a, b).

が表面を覆う足細胞および血管内皮細胞を透過して検出されるためである. その結果, 基底膜の形状の違いや変化 (菲薄, 肥厚, 蛇行, 免疫物質の基底膜内沈着によるスパイク形成, 点刻像, 新生, 二重化など) が明瞭に捉えられた (図 8). 疾患の進行度によっては, 顕微鏡ではとらえ難いごく初期の微細なスパイク形成なども高倍率で観察でき (図 8e), さらに TEM 像の所見 (図 8c) から提唱されている膜性腎症における病期 (stage) 分類<sup>1)</sup> に有用な知見が低真空 SEM 像でも得られた<sup>10)</sup>.

以上述べたように, 本法では糸球体の表面や断面の形状変化だけでなく, 基底膜の厚さ計測や免疫物質の沈着状況 (病状の進行度) といった, 従来は TEM でしか得られなかった詳細な病理所見をパラフィン切片を使用して解析することが出来た. 特に, 生検時に電顕用の標本が得られず顕微鏡観察

だけでは診断が難しい場合には, 低真空 SEM を用いる本法によってより幅広い腎生検標本の解析が可能になるとと思われる.

### 5. おわりに

日頃から電顕診断に携っておられる方や SEM 経験者は, 「パラフィン切片を SEM で観察! ?」と驚かれたかもしれない. しかし, 染色方法や観察手段などを工夫して低真空 SEM で観察してみると, 特に腎生検標本では予想以上に糸球体の微細構造が立体的に描出され, なおかつ顕微鏡や TEM ではとらえ難い三次元情報が比較的容易に得られることが明らかとなった. 「たかがパラフィン切片, されどパラフィン切片」である. もちろん, 質的診断レベルにおいては TEM には及ばないものの, 本法は, TEM による詳細な診断結果が出てくるまでに, 臨床医自身が低真空 SEM を操作して鑑別点の検索をすることができる簡便な手段になり得ると考えている. 実際に低真空 SEM によって糸球体基本構造の三次元像をパラフィン切片上で把握することで, 顕微鏡の理解が一層深まってくることも実感している. また, パラフィン切片が残されていれば, レトロスペクティブな三次元構造の解析も可能である. 腎生検以外の他の病理組織標本や臨床材料においても電顕用のサンプルが得られない場合, パラフィン切片からの戻し電顕法も有用であるが, より簡便で迅速な本法を試してみることを是非お勧めしたい. 特に, PAM 染色標本のように重金属染色をうまく利用すれば, 表面の細胞や組織を全く除去することなくその下に存在する基底膜や結合組織の形態を捉えることも可能であり, 様々な応用があると思われる. さらに, 最近開発された免疫蛍光染色像と低真空 SEM 像を重ね合わせて検証できる画像検証ソフト (AZblend: (株) アストロン) なども利用可能で, TEM 標本の作製や診断に先立って, 免疫物質の沈着部位のような病変部の把握にも本法は役立つであろう.

以上紹介したように, 低真空 SEM を用いた本法が, 従来の顕微鏡法, 電顕法 (TEM) を補う新規の迅速電顕解析法として, 腎生検診断において今後幅広く活用されることを期待している.

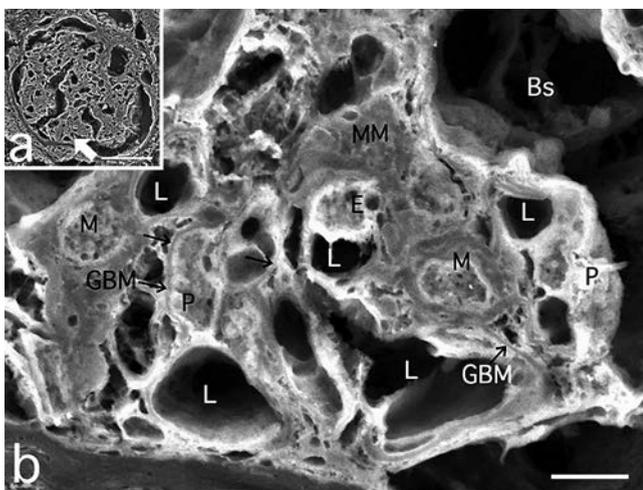


図7 糸球体断面の低真空 SEM 像 (白金ブルー染色: IgA 腎症). 1 個の糸球体 (a) と, その矢印で示す部分の拡大像 (b). 白金ブルー陽性の足細胞 (P), 血管内皮細胞 (E) が最も明るく, メサンギウム細胞 (M) はやや明るい. 白金ブルー陰性で暗いライン状を呈する基底膜 (GBM  $\rightarrow$ ) と暗い領域としてメサンギウム基質 (MM) が識別できる. Bs: ボウマン腔, L: 毛細血管腔. スケール:  $50 \mu\text{m}$  (a),  $5 \mu\text{m}$  (b).

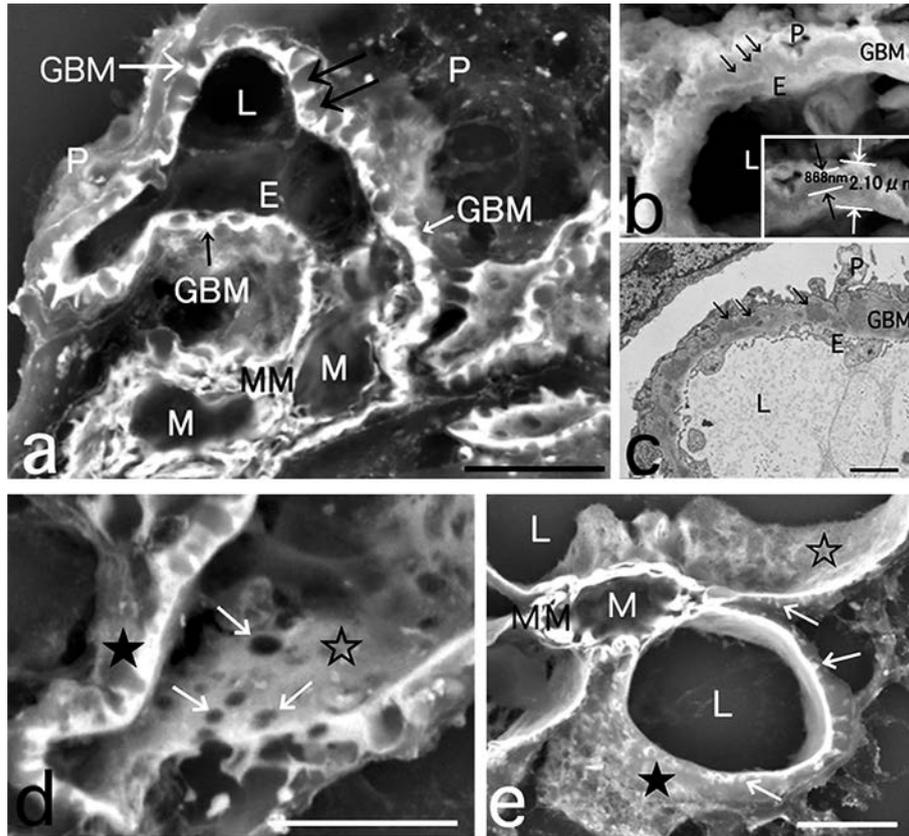


図8 糸球体基底膜の低真空SEM像とTEM像（膜性腎症）。（a, d, e）PAM染色像：PAM陽性の基底膜（GBM→）とメサンギウム基質（MM）が明るく明瞭。断面像では、膜性腎症に典型的な基底膜のスパイク形成像を呈す。表面を覆う足細胞（P）と血管内皮細胞（E）、および免疫物質（黒矢印）やメサンギウム細胞（M）はPAM陰性のため、暗く不明瞭。（b）白金ブルー染色像：陽性部がPAMとは逆で、足細胞（P）、血管内皮細胞（E）は明るく、陰性部の基底膜（GBM）は暗く示されるため境界が明瞭で、基底膜に肥厚および蛇行がみられる。また、その厚さを計測することができる（挿入図）。基底膜中の免疫物質（黒矢印）はやや明るく認められる。（c）同一サンプルのTEM像。基底膜（GBM）や免疫物質（黒矢印）は電子密度が高い。（d, e）基底膜の足細胞側（★）と血管腔側（☆）の表面形状が観察でき、（d）では、血管腔側の基底膜面は平坦で様々な大きさのホール様構造（白矢印）が認められる（症例1：stage II～III）。（e）では、基底膜の足細胞側に高さ0.5 μm以下の小さな突起（白矢印）が多数認められる（症例2：初期～stage I）。L：毛細血管腔、Bs：ポウマン腔。スケール：5 μm（a, d, e）、2 μm（c）。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、腎生検病理診断に関して貴重なアドバイスを頂きました元新見公立短期大学教授 内藤一郎先生、鳥取大学医学部分子病理学分野助教 加藤雅子先生、鳥取大学医学部周産期・小児医学分野准教授 岡田晋一先生、鳥取大学医学部機能病態内科学分野講師 宗村千潮先生、および低真空SEM観察にご協力頂きました（株）日立ハイテクノロジーズの各氏に感謝致します。

## 文 献

- 1) 日本腎臓学会・腎病理診断標準化委員会：日本腎病理協会（編）、腎生検病理アトラス「腎生検病理診断標準化への指針」病理改訂版、東京医学社、東京、56-67（2010）
- 2) 頼岡徳在：広島大学医学雑誌、28(6)、711-764（1980）
- 3) Arakawa, M.: *Am. J. Pathol.*, 64, 457-466（1971）
- 4) Arakawa, M. and Tokunaga, J.: *Lab. Invest.*, 27, 336-371（1972）
- 5) Hidaka, S., et al.: *J. Clin. Electron. Microsc.*, 23, 5-6（1990）
- 6) NG, W., So, K.F. and Ngai, H.K.: *Pathology*, 14, 299-302（1982）
- 7) Tarpley, P.A. and Williams, G.: *Med. Lab. Sci.*, 37, 57-80（1980）
- 8) Bonsib, S.M.: *Kidney Int.*, 27, 678-684（1985）
- 9) 稲賀すみれ他：第48回日本組織細胞化学会総会、第39回日本臨床分子形態学会総会合同学術集会講演予稿集、96（2007）
- 10) Inaga, S. et al.: *Arch. Histol. Cytol.*, 73, 113-125（2010/2011）
- 11) Robinson, V.N.E.: *J. Microsc.*, 103, 71-77（1975）
- 12) 渡邊俊哉：精密工学会誌、77, 1021-1026（2011）
- 13) 中村美樹, Toth Milos：顕微鏡、43, 177-180（2008）
- 14) Tanaka, K. and Inagaki, K.: *J. Electron. Microsc.*, 42, 255（1993）
- 15) Tanaka, K., Inaga, S. and Iino, A.: in Motta, P. (Ed.), *Recent advances in microscopy of cells, tissue and organs*, Antonio Delfiro Editore, Rome, 31-35（1997）
- 16) Hashizume, H., Itoh, S., Tanaka, K. and Ushiki, T.: *Arch. Histol. Cytol.*, 61, 93-98（1998）
- 17) 尾上孝利, 足立裕亮：医生電顕技術誌、23, 63（2009）
- 18) 田中敬一：タマムシの翅はなぜ玉虫色か、講談社ブルーバックス、講談社、東京、207-211（1995）
- 19) 松浦絵里：医生電顕技術誌、24, 46（2010）
- 20) Inaga, S. et al.: *Arch. Histol. Cytol.*, 70, 43-49（2007）
- 21) Yoshikawa, K. et al.: *Brain Res.*, 1367, 22-32（2011）
- 22) Chiba, Y. et al.: *Neuropathology*, 34, 49-57（2014）
- 23) Inaga, S. et al.: *Arch. Histol. Cytol.*, 72, 101-106（2009）