

# 超薄連続切片自動回収機 ATUM を用いた試料作製法 Automated Tape-Collecting System Ultra-Microtome (ATUM) for Three-Dimensional Reconstruction of Biological Tissue

岩 崎 広 英

Hirohide Iwasaki

東京大学大学院医学系研究科神経細胞生物学分野

**要 旨** 近年、電子顕微鏡による生体組織の三次元再構築技術が飛躍的に進歩している。特に走査型電子顕微鏡を利用した三次元再構築については様々な技術が開発されている。本稿では、その一つとしてプラスチックテープ上に超薄連続切片を自動回収する装置 ATUM について、その利点や実際の使用方法について光学顕微鏡との併用も含めて紹介する。

**キーワード**：三次元再構築、走査型電子顕微鏡、コネクトーム、ATUM、光一電子相関顕微鏡法（CLEM）

## 1. はじめに

近年、生体組織の微細構造の三次元再構築解析の重要性が一段と高まっている。とくに神経科学の分野では神経回路を網羅的に解析する、いわゆる「コネクトーム」プロジェクト<sup>1)</sup>が世界中で展開されつつあるが、神経細胞どうしの結合をシナプスレベルで解析するためには電子顕微鏡の高い分解能が必要であり、広範囲に亘る神経回路を効率的に三次元再構築するための技術の必要性が急速に高まっている。

従来はウルトラミクロトームを用いて超薄連続切片を作製し、グリッド上に切片を回収して透過型電子顕微鏡で観察するのが一般的であった。しかしこのような手法では操作自体に熟練を要する上、たくさんの切片を回収するには多くの時間と手間がかかる。また、できるだけ多くの切片を載せようとすると切片一枚あたりの面積を抑える必要がある。

これらの問題点を解決すべく、近年、走査型電子顕微鏡を用いた三次元再構築のための様々な技術開発が相次いでなされている。例えば2004年にマックスプランク研究所のWinfried Denkらにより報告されたSBF-SEM (Serial Block Face-SEM) は、試料を超薄切片化する代わりに試料ブロックの表面をダイヤモンドナイフで切削しては表面を走査型電子顕微鏡で画像取得していく<sup>2)</sup>。同様にFIB-SEM (Focused Ion Beam-SEM) では、ダイヤモンドナイフの代わりにイオン集束ビームを用いて試料を切削し、画像取得していく<sup>3)</sup>。これに対し、本稿で紹介するATUM (Automatic Tape-collecting Ultra-Microtome) は超薄連続切片をプラスチックテープ上

に自動回収する装置である<sup>4)</sup>。そして、テープ上に回収した切片を光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡を用いて画像取得する。

## 2. ATUM の構成

ATUMはハーバード大学のJeff Lichtmanらが開発した装置であり、従来のウルトラミクロトームに取り付けて切片を自動回収する。実際の装置を図1に示す。図1AにあるようにATUMには2つのロールが取り付けられており、下側のロールには新しいテープが巻かれていて、このロールから送り出されたテープが先端部を通過して上側のロールに回収される。切片回収部が図1Bのようにダイヤモンドナイフのポート内に入り、ポート内の水面に浮かぶ切片をベルトコンベア式にテープ上に回収する。テープの送り出し・回収のスピードは二つのモーターにより制御されており、これらのモーターの挙動は専用のソフトウェアで調節できる。同時に、このソフトではテープの張力を常にモニターしており、テープがどこかで引っかかったり弛んだりしていれば、すぐに分かるようになっている。長時間にわたって切片を回収する場合、蒸発やテープへの吸着によりダイヤモンドナイフのポート内の水は少しずつ失われ、ダイヤモンドナイフでの切片作製に支障をきたすことが懸念されるが、これを防ぐために自動的に給水して水量を一定に保つシステムも付加されている(図1C)。このようにして超薄切片の作製およびテープ上への回収が自動化されており、単純計算すると一晩で約3千枚程度の切片を自動的に回収することができる。切片を自動的に回収することで時間や労力をセーブできるだけでなく、人の手で回収困難な30 nm以下の極めて薄い切片であっても安定的にテープ上に回収できることもATUMを利用するメリットのひとつである。

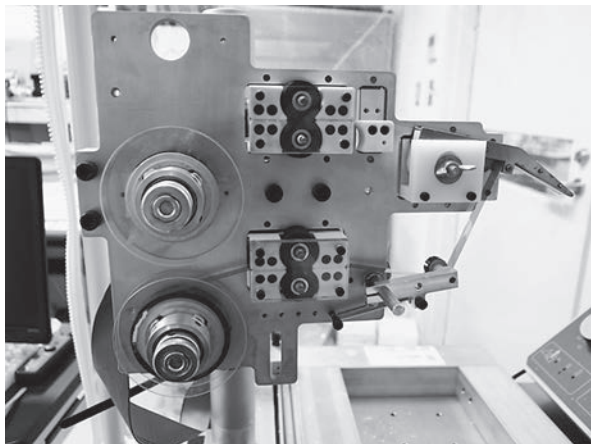
〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

TEL: 03-5841-1929

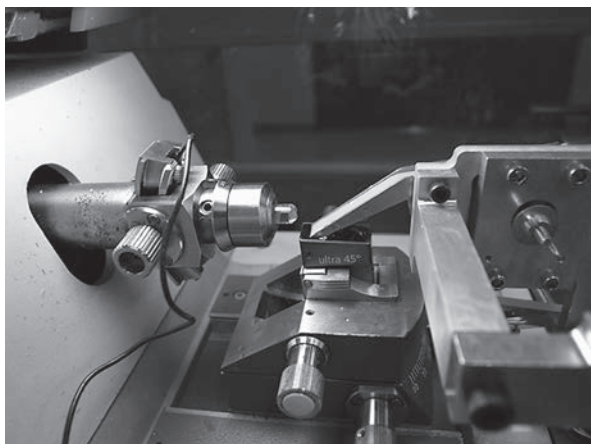
2014年9月1日受付

なお当初の開発段階では、試料は旋盤 (Lathe) の軸上に設置されるように設計されていた。試料を載せた軸が回転するとダイヤモンドナイフに当たって切片化される仕組みとなっており、このため開発初期に作製された装置は

(A)



(B)



(C)

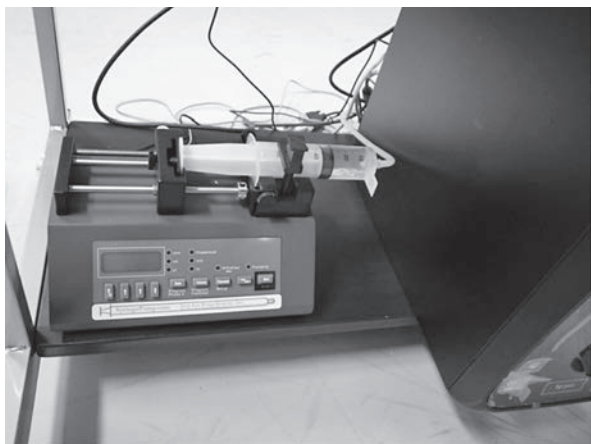


図1 ATUM

(A) ATUMの全体像。(B) ATUMの切片回収部。ダイヤモンドナイフのポート内にセットして切片を回収する。(C) 自動保水装置。水面レベルの低下を検出して自動で水を補給する。

ATLUM (Automatic Tape-collecting Lathe Ultra-Microtome) と命名された<sup>5)</sup>。しかし機械自体が大がかりになることや、切片を回収する部分のみ自動化すれば安定して切片を回収できることなどから、現在ではブロックの薄切は既存のウルトラミクロトームに任せ、切片回収部のみ独立させる形で ATUM として再命名されている。

ちなみに ATUM は Lichtman 研究室のメンバーであった Kenneth Hayworth (現 Janeria Farm) によって開発され、同じく Lichtman ラボのメンバーである Richard Schalek と共に SynptoScopics というベンチャー企業を立ち上げて ATUM の製作・販売を開始した。その後 SynptoScopics 社は Boeckeler 社に買収され、現在 ATUM は Boeckeler 社が製作・販売している。筆者は 2011 年まで Lichtman 研究室に所属し、帰国して現所属に移籍する際に二人に ATUM の作製を依頼した。このため筆者が所有している ATUM は SynptoScopics 社時代のものであり、図1の写真も旧版であるので、その点ご留意頂きたい。現在 Boeckeler 社から販売されている製品では、配線等はボックス内に収められており SynptoScopics 社時代のものと比べてすっきりとしているが、機械の全体的な構成や使用法は同じである。

### 3. ATUM を用いた超薄連続切片作製と観察

ATUM で使用する試料の作製のプロトコールは、従来の透過型電子顕微鏡で観察するものと基本的に同じで良い。すなわちグルタルアルデヒドおよびパラホルムアルデヒドで固定した後、オスミウム酸による後固定を行い、脱水後 Epon や Durcupan などの樹脂に包埋する。

さらに透過型電子顕微鏡の際と同じく試料ブロックをトリミングするが、この際の試料の面積はグリッドに回収する場合よりも大きめで良い。ダイヤモンドナイフでブロックを薄切し、プラスチックテープ上に切片を回収するが、この際 ATUM の切片回収部をできるだけダイヤモンドナイフに近づけることとなる。しかし、あまりに近づけるとダイヤモンドナイフを破損する恐れがある上、ATUM からの振動が伝わりやすくなるので、ダイヤモンドナイフと切片回収部との間に数ミリメートル程度のスペースを設ける必要がある。ダイヤモンドナイフで作製された切片はリボンとなって ATUM の切片回収部に到達するとプラスチックテープに回収される。このため、あまりに小さくトリミングしてしまうと多くの切片が一度に纏めて回収されてしまい、次に切片が回収するまでにテープ上に長い余白ができてしまう。一定間隔で切片を回収するためには、むしろ大きめにトリミングし、ダイヤモンドナイフと ATUM の切片回収部との間を 2, 3 枚の切片でカバーできる程度にした方が安定して切片を回収できる。

切片の厚みは 40–60 nm 程度であれば問題なく観察できる。もっと厚い試料でも観察可能であるが、なるべく薄い方が望ましい。試料回収用のプラスチックテープとして、筆者らはカプトンテープを使用している。切片回収の際には、テープ送りのスピードと試料の薄切のスピードとを概ね一致させて



おくことが重要である。テープ送りのスピードがあまりに遅いと切片がダイヤモンドナイフと ATUM の切片回収部との間に詰まって皺が寄るし、逆にテープ送りのスピードが速すぎると切片と切片の間隔が開きすぎて、その後の電子染色やカーボンコーティングなどのステップに支障をきたすためである。

切片の載ったプラスチックテープを適当な長さに切断し、ウラン染色および鉛染色を施す。グリッドに比べると大量の溶液が必要となるが、少しでも使用量を減らすために筆者らはパラフィルムを利用している。パラフィルムの上に少量の溶液を滴下し、その上に試料の載った面を下に向けてテープをパラフィルム上に置く。パラフィルムとテープの隙間に溶液が広がるようにすることで、少量の溶液でテープ全体をカバーすることができる。

その後プラスチックテープを、試料の載った面を上にしてシリコンウエハ上に瞬間接着剤で貼り付ける。瞬間接着剤は一般用アロンアルファで全く問題ないが、種類によっては

テープに凹凸を生じることもあるので注意が必要である。シリコンウエハの上の試料は、このままだと電子顕微鏡内で試料が帯電してしまい観察できないので、カーボンコーティングを施してから観察に供する。

ATUM で回収された切片は、その下に厚いテープがあるため透過型電子顕微鏡では観察できず、走査型電子顕微鏡での観察となる。観察の際には、まず二次電子検出器で焦点を合わせておいてから、反射電子検出器に切り替えて観察する。通常 10–15 kV 程度の加速電圧で観察している。

図 2 に ATUM で回収した切片の例を示す。細胞膜やミトコンドリアなどの細胞内小器官は勿論、シナプス小胞や後シナプス肥厚部も透過型電子顕微鏡と比較しても遜色なく観察できる。特に後シナプス肥厚部については SBF-SEM や FIB-SEM ではあまり明瞭に観察できないが、ATUM で回収した切片の場合は明瞭に観察できる。

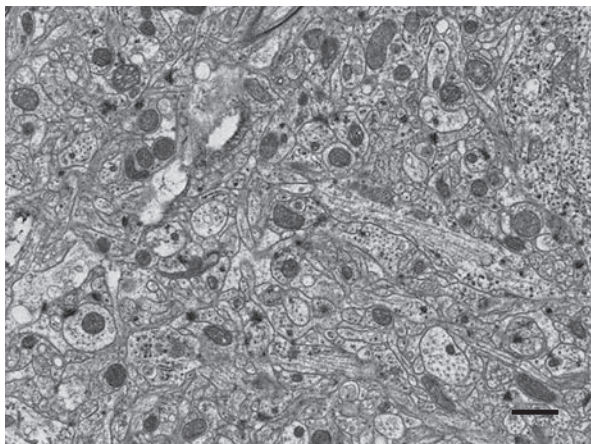
#### 4. ATUM による光学顕微鏡用試料の作製と観察

FIB-SEM や SBF-SEM と比較した際の ATUM の最大のメリットは、同じ試料を何度でも観察可能であるという点であろう。FIB-SEM や SBF-SEM の場合、試料を削っては観察していくため、一度観察した部分はその直後には削り取られてしまい、再度見返すことはできない。その点、ATUM の場合は切片がテープの上に回収されているため、必要に応じて何度でも同じ試料を観察することができる。このため、いわゆる光一電子相関顕微鏡法 (CLEM) にも ATUM は有用であると考えられる。

電子顕微鏡での観察は高分解能での画像取得が可能な反面、観察できる範囲に限られるというデメリットがある。さらに電子顕微鏡像は白黒であり、例えば画像の中のどの部分がどの細胞なのかを区分する、いわゆるセグメンテーションの問題が常につきまとう。一方、光学顕微鏡を用いた画像取得では、比較的広範囲からの画像取得が可能であり、様々な色を用いて個々の細胞等を区別することができる反面、分解能の点では電子顕微鏡に劣る。例えば神経科学の分野では、光学顕微鏡を用いて個々の神経細胞を識別することは可能であるが、光学顕微鏡の分解能は約 200 nm 程度であり、シナプス間隙は約 25 nm、シナプス小胞の直径は約 40 nm であることから光学顕微鏡では観察できず、神経細胞同士がシナプスを形成しているか否かについて識別することはできない。一方で、電子顕微鏡では個々のシナプスは観察できるが、シナプスを形成している細胞どうしの全体像を把握することは困難であるというジレンマが生じる。従って、広範囲に亘る神経回路を網羅的に記載するためには、光学顕微鏡と電子顕微鏡の両者の利点を活かした観察技術が必要となる。

Array Tomography はスタンフォード大学の Stephen Smith らにより開発された手法であり、まさに光学顕微鏡技術と電子顕微鏡技術の融合的手法である<sup>6,7)</sup>。まず LRWhite などの親水性の電子顕微鏡用樹脂に脳を包埋し、ウルトラマイクロームを用いて 50 ~ 250 nm の厚さの超薄連続切片を作成

(A)



(B)

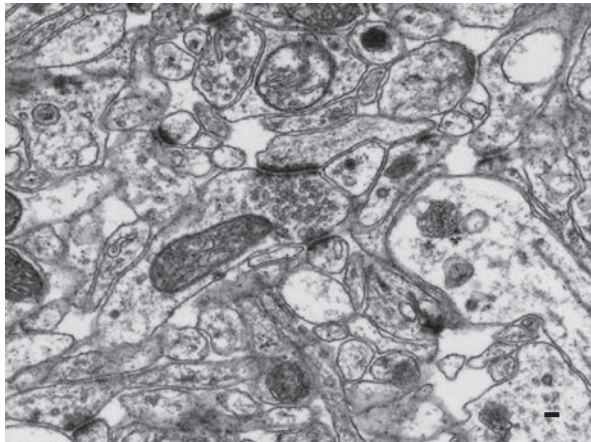


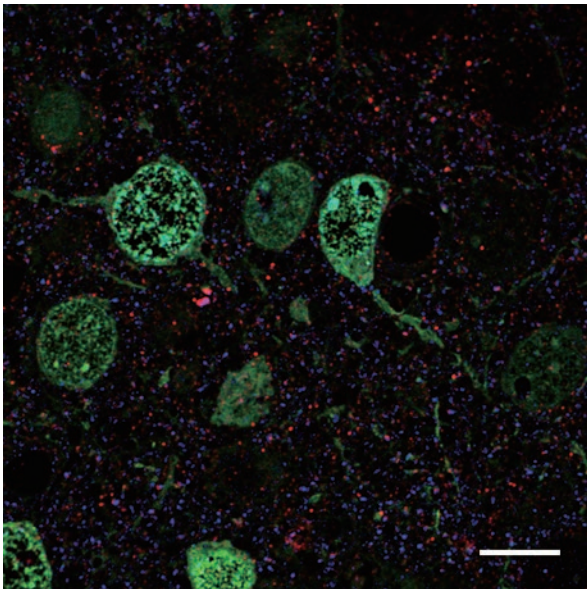
図 2 ATUM で回収したマウス脳超薄切片の走査型電子顕微鏡像。マウス大脳皮質体性感覚野を Epon 樹脂に包埋し、50 nm に薄切してカプトンテープ上に回収し、走査型電子顕微鏡で観察。スケールバー = (A) 1  $\mu$ m, (B) 100 nm

する。こうして得られた連続切片を光学顕微鏡で画像取得し、得られた画像を三次元構築する(図3)。これら一連の操作により高解像度の画像を広範囲に亘って取得することが可能となる。親水性樹脂であることから包埋の際に完全に脱水する必要がなく、したがって包埋後も蛍光タンパク質の蛍光が損なわれない。また、共焦点レーザー顕微鏡や二光子励起顕微鏡のz方向の分解能は750 nm ~ 1 μmであるので、光学分解能以下に薄切することで試料に垂直な方向での分解能が向上し、同時に試料と平行な平面においても上下からの余分なノイズを排除できるというメリットもある。なお、筆者はYFPなどの蛍光タンパク質そのものの蛍光を利用する場合には250 nm程度の厚さに薄切し、蛍光抗体を用いて染色する場合には50-70 nm程度の厚さの切片を利用することが多い。試料に発現している蛍光タンパク質の量にも因るが、経験上、100 nm以下に薄切すると途端に暗くなって画像取得に支障をきたすことが多い。Smithらはゼラチンコートした

カバーガラス上に切片を回収しているが、ATUMを用いれば切片をテープ上に自動回収して光学顕微鏡で観察できる。ただしプラスチックテープは自家蛍光を有するため注意が必要である。筆者はカプトンテープにアルミコートしたものをしている。

LRWhiteに包埋され、超薄切片化した試料は免疫染色にも利用できる。抗原分子は樹脂中に強固に保持されるため、いったん免疫染色に用いた切片から抗体を洗い流し、再利用することも可能である。したがって多重染色の際に問題となる、二次抗体の標識蛍光化合物のスペクトルのオーバーラップなどの問題を気にすることなく、同一切片中での複数分子の局在を比較することも可能である。またSTED顕微鏡やSTORM顕微鏡などの「光学顕微鏡の分解能を超える」超解像顕微鏡に利用することで、電子顕微鏡の解像度に迫る高解像度の光学イメージの取得も期待できる。このようにして光-電子相関顕微鏡法により光学顕微鏡像と電子顕微鏡像とを照らし合わせることで、より多くの情報を得ることができる。

(A)



(B)

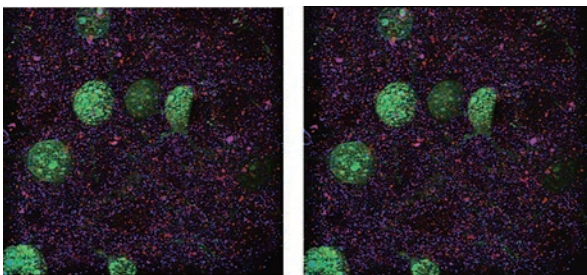


図3 ATUMで回収したマウス脳切片の光学顕微鏡像 PSD95-GFPおよびDsRed(緑)を子宮内穿孔法により遺伝子導入したマウス大脳皮質体性感覚野をLRWhiteに包埋し、250 nmの連続切片にしてATUMで回収。VGluT1(赤), GFP(青)に対する抗体で免疫組織化学染色を行った。(A)スケールバー=10 μm。(B)三次元再構築像(ステレオペア表示)。

## 5. 今後の課題

これまでではATUMの利点を主に述べてきたが、ATUMはまだ改善の余地が多く残されている。例えばテープを交換する際にプラスチックテープがローラーに巻き込まれたり、回収した切片に皺が寄ったりするなどのトラブルが起りやすい。特に後者についてはテープの静電気を除去したり、切片回収部の角度やダイヤモンドナイフと切片回収部までの距離を調節したりして対処することとなるがノウハウや慣れが必要である。

その他、前節で述べたように光学顕微鏡と電子顕微鏡とで同じ試料を観察するためには、蛍光を保持したまま電子顕微鏡で観察可能な試料作製法を開発する必要がある。しかし、GFPなどの従来の蛍光タンパク質では、オスミウム酸での処理や脱水により蛍光が消失してしまい、蛍光顕微鏡での観察に適さなくなってしまう。従って、オスミウム酸処理や脱水などの操作を施しても蛍光が保持されるようなプローブの開発が期待される。

また、ATUMを用いた切片の最大の難点は、FIB-SEMやSBF-SEMの場合と異なり切片の方向が一定でないため、取得した画像をコンピューター上で大幅にアラインメントする必要がある点である。この他にも、三次元再構築した画像をセグメンテーションするためのソフトウェアの開発などコンピューターサイエンスの大幅な進歩が期待される面も少なくない。とくにATUMをはじめとして三次元再構築のための電子顕微鏡のハードウェアの面での進歩は近年目覚ましいが、取得した膨大なデータをどのように処理したり利用したりするかについては、現在のコンピューターのスペックでは不十分であり、どのようにしてこの問題をクリアすべきかが今後の重要な鍵となるものと思われる。

## 文 献

## 謝 辞

本研究を始めるにあたりご指導ご協力頂いたハーバード大学の Jeff Lichtman 教授と Lichtman 研究室のメンバーに、また現所属でご指導頂いている東京大学の岡部繁男教授に御礼申し上げます。

- 1) 岩崎広英：実験医学, 30, 1334–1340 (2012)
- 2) Denk, W. and Horstmann, H.: *PLoS Biol.*, 2, e329 (2004)
- 3) 太田啓介, 中村桂一郎：顕微鏡, 47, 176–180 (2012)
- 4) Hayworth, K.J. *et al.*: *Frontiers in Neuroscience*, 8, 68 (2014)
- 5) Hayworth, K.J. *et al.*: *Microsc. Microanal.*, 12, 86–87 (2006)
- 6) Micheva, K.D. and Smith, S.J.: *Neuron*, 55, 25–36 (2007)
- 7) Micheva, K.D. *et al.*: *Neuron*, 68, 639–653 (2010)
- 8) Hell, S.W. and Wichmann, J.: *Optics Letters*, 19, 780–782 (1994)
- 9) Rust, M.J. *et al.*: *Nat. Methods*, 3, 793–795 (2006)