

超高圧電子顕微鏡を用いた生物試料観察の基礎と応用

The Basis and Application for the Observation of Biological Materials
with High Voltage Electron Microscopy小 澤 一 史^{a, b}

Hitoshi Ozawa

^a 日本医科大学大学院医学研究科生体制御形態科学分野^b 大阪大学超高圧電子顕微鏡センター

要 旨 超高圧電子顕微鏡を用いて生物試料の微細構造を立体的に観察する有用性を示す。構造が複雑な展開を示すもの、方向性が不鮮明な不整形の構造などの観察には大きな力を発揮することが考えられる。これまでの、よく用いられてきたステレオ観察に加え、近年ではトモグラフィー観察の技術も進み、微細構造の三次元化が容易に出来るようになりつつある。従って、超微細構造を局所的観察で考察することから、微細構造の全体像を捉えることが出来るようになりつつある。ユニークなアイデアの惹起によって、超高圧電子顕微鏡が生物試料観察に、さらに大きな手助けを示す可能性が示唆される。これまで我々が行ってきた、神経細胞、神経膠細胞の機能形態学的変化を、超高圧電子顕微鏡を用いて解析するデータも示しながら、実際の有用性について説明する。

キーワード：超高圧電子顕微鏡，三次元観察，トモグラフィー，神経細胞，神経膠細胞

1. はじめに

電子線照射を用いる電子顕微鏡は、0.2 μm という光学顕微鏡の分解能の限界値をはるかに超えた nm (1 nm=1/1,000 μm) から Å (1Å=0.1 nm) という単位で、極めて微細な構造を観察できる高い解像度をもつ。この解像度を利用して、電子顕微鏡は 1950 年代半ばから本格的に医学や生物の場に導入され、その後半世紀で様々な細胞小器官、神経細胞間の伝達場であるシナプスの構造など、細胞、組織の微細構造の発見とその機能の解析に多大なる貢献をしてきた。この間、電子顕微鏡自体の進化も目覚ましいものがあり、電子線源、照射解析系、試料支持、操作、撮影、画像処理など、コンピュータ技術の進化とも相まって、着実な発展を積み重ねてきている。西暦は 2000 年を越え、21 世紀に入り、電子顕微鏡の貢献は生物学的意義と工学的意義の境を跨ぎ、両者の線引きを払拭しつつ、自然や生命を様々な角度から理解する新しい視点を見出しつつある。

超高圧電子顕微鏡 (High voltage electron microscopy; UHVEM) は、照射する電子線の加速電圧を高めた極めてユニークで特殊な電子顕微鏡である。もともとは非生物材料の構造観察、解析を目的として開発され実用化されたものであり、本格的な生物学的応用は、ここ 20 ~ 30 年の出来事であ

る¹⁻³⁾。超高圧電子顕微鏡を用いた、生物研究に関わる研究者の間では、その特徴や利点、可能性などについての情報を共有し、また研究者間の情報交換も多少ながら行われるが、実際に解剖学、病理学、神経科学などの専門分野の学会や研究会で、それらが紹介されても、超高圧電子顕微鏡なるものがどういったものであるかの理解が浅く、一般に十分に知れ渡るまでには至っていないのが現状である。

本稿においては、まず、超高圧電子顕微鏡の生物学的利用の基礎と応用について解説し、通常の電子顕微鏡との比較を論じつつ、具体的な応用例を提示し、今後の可能性についても触れ、本特集の「序」としたい。

2. 超高圧電子顕微鏡の基本構造と特性

超高圧電子顕微鏡は、基本的構造は通常の透過型電子顕微鏡とほとんど同じである。通常の医学生物学に用いられる透過型電子顕微鏡は加速電圧が 100 kV 前後であるのに対して、超高圧電子顕微鏡は 1,000 kV ~ 3,000 kV に達する。この超高圧の電子線を発する電子顕微鏡は、その外観も極めて巨大である (図 1)。その高さは電子銃の部分だけでもビルの 2 階分を優に超え、照射系から撮影系まで全てを含めて納めるにはビル 3 ~ 4 階分の高さとなり、専用の建物が必要になる。

内部構造は、電子銃、照射 (レンズ) 系、試料室、結像系、観察室、カメラ室など、基本構造は通常の透過型電子顕微鏡とほとんど同じである。ただし、高電圧によって加速され放出された電子線が試料に照射されて、像が確実に結ばれるためには、精度の高い制御システムが必要になってくる。この

¹ 〒 113-8602 東京都文京区千駄木 1-1-5
TEL: 03-3822-2131; FAX: 03-5685-6640
E-mail: hozawa@nms.ac.jp
2008 年 9 月 25 日受付

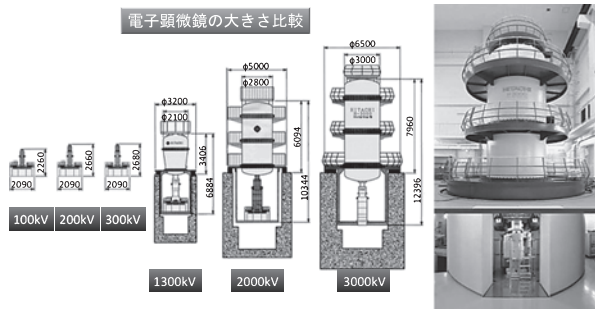


図1 各種透過型電子顕微鏡の大きさの比較図。右側の写真は大阪大学超高压電子顕微鏡センターの3000 kV 超高压電子顕微鏡（図提供：大阪大学，日立ハイテクノロジーズ）

ために，鏡筒内全体を 10^{-6} Pa 以下の高真空度を常に保つ必要が生じ，排気真空系，試料に様に露光照射するための各種レンズ系，装置内での試料支持のための除振や試料ホルダーの開発が必要になる。

一般に，加速電圧が 100 kV 以下の通常の透過型電子顕微鏡では，加速電圧が高まるにつれて蛍光板上の像は明るくなり，数万倍の高倍率での解像度が特に向上する。しかし，その一方で像のコントラストは低下する。この特徴は，超高压電子顕微鏡においても同様であり，従ってその特徴を生かして生物学的応用が可能になる。そこで，超高压電子顕微鏡における超高压加速電子線の照射，超高压電子顕微鏡特有の構造によって得られる顕微鏡像について触れることにする。

3. 超高压電子顕微鏡による生物試料の観察

電子顕微鏡の蛍光板に像をきちんと結像するためには，試料に含まれる細胞・組織の種類，染色などの条件の把握が必要であるが，大きな要因の一つに観察試料の厚さがあげられる。通常の透過型電子顕微鏡（100 kV）では，例えばごく一般的に用いられるグルタルアルデヒド-オスミウム酸による二重固定後，（場合によりウランブロック染色を加え）エポキシ樹脂に包埋し，切片を作成して，ウラン・鉛染色によってコントラストを付ける方法では，おおよそ 60～90 nm の厚さの超薄切片の観察が行われる。加速電圧が高まると，この試料の透過性も高まっていく。しかし，同じ電子顕微鏡で，200～300 nm の切片を観察すると像自体は観察することが出来るが，きっちりとした焦点合わせが難しくなり，細部の構造が不鮮明となる。このことは，100 kV の加速電圧でも，電子線はこの厚さの試料を透過することは出来るが，適切な解像度を得るには不十分であることを物語るものである。この切片を 200 kV の電子顕微鏡で観察すれば，解像度は格段に向上する。一方，1000 kV～3000 kV の超高压電子顕微鏡を用いて，この切片を観察すると，逆にコントラストが低下し，あるいは何も識別出来ない可能性も出てくる。1000 kV 以上の高い加速電圧が加わる場合には，実用的には 3～5 μm の厚さの切片を電子線が透過し，顕微鏡像を結ぶ。従って，通常の透過型電子顕微鏡の観察試料の 40～80 倍の厚み

(A)



(B)

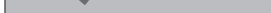


図2 (A) 通常の透過型電子顕微鏡観察用の超薄切片（厚さ 80 nm）の模式図。(B) 超高压電子顕微鏡用に作成した厚切り切片（厚さ 5 μm ）の模式図。(A) と (B) は実際の厚みの違いと同じ状況を再現している。両者を比べたとき，厚切り切片において z 軸方向の情報が極めて広がる事が理解できる。

を持った切片の観察が可能となる。すなわち，通常の透過型電子顕微鏡に比べて，40～80 倍，z 軸方向の情報を加えて観察することが出来ることを意味する（図2）。このことは超微細構造の三次元化の可能性を意味するものである。

加速電圧が高まることは，電子線の試料透過能とそれによる解像度の向上を生み出す。しかし，試料が薄ければ薄いほど，切片の一断面を蛍光板上に結像するので，適切なコントラストが設定できるのであれば，細胞，組織の二次元的な微細構造を観察するには，むしろ通常の透過型電子顕微鏡で十分であり，また適している。これに対して，高電圧で加速された結果得られる電子顕微鏡像は，厚い試料を透過した結果の投影像であり，その厚みの中には薄い試料に比べて，多くの情報量が含まれることもある。具体的には厚みのある試料の情報は二次元的情報（x-y 面の情報）から，厚みという z 軸方向の情報を加えることになり，このことは二次元的な微細構造の情報が z 軸方向分の厚さ重なり，それが 1 つの圧縮像として投影され，結像されていることを意味する。そこで，生物学的には超高压電子顕微鏡の蛍光板に投影された三次元情報（z 軸方向）を含む圧縮された二次元的投影像をいかにして三次元に戻し，三次元的微細構造を描出するかが重要な応用ポイントとなってくる。

そのための手段として，現在，2 つの方法が用いられる。1 つは観察する試料を傾斜して撮影し，撮影した複数の傾斜像から立体像を得る方法である。試料ホルダーを $\pm 8^\circ$ に傾斜し，それによって得た組写真をステレオ観察する。裸眼視が難しい場合には特別のステレオスコープによって立体視する。

さらに 2 枚のステレオ像の原理を用いて，より詳細に発展応用するのがトモグラフィー観察法である。試料ホルダーの傾斜角度を $\pm 60^\circ$ に広げ， 1° 毎に連続撮影を行う。これによって得られた観察像をコンピュータソフト（cf. IMOD）によ

て処理することにより、三次元化して観察することが出来る。

細胞内微細構造や細胞の全体像などの観察に加え、免疫組織化学法を用いた物質局在の解析について、特に微細構造上の局在解析には電子顕微鏡レベルの解析がもっとも詳細で確実な情報が得られる。二次元的な微細構造の情報を連続的に重ね合わせて、三次元的情報を再構築することも可能であるが、この場合には連続切片の観察という、極めてハードな課題をこなさなければならない。この点、はじめから厚みのある切片を一度に観察することが出来る超高压電子顕微鏡はより簡便なものであり、勝手がよい。しかしながら「超高压」によって透過する電子線に反応する、言い換えればコントラストを作り得る染色、マーキングが必要になる。これらの超高压電子顕微鏡観察のための長所、短所を理解し、研究展開の戦略と組み合わせることにより、超高压電子顕微鏡が微細構造の三次元化という極めて魅力的な情報描出のツールになり得る。

4. 超高压電子顕微鏡による神経細胞、神経膠細胞の観察

さて、実際の超高压電子顕微鏡による観察例を示す。その代表的なものにゴルジ鍍銀染色による脳の神経細胞や神経膠細胞の観察がある。ゴルジ鍍銀染色自体は、19世紀末にかの有名な Camillo Golgi によって開発された染色法であり、極めて古典的な染色技法で、その原理については未だははっきりしない点も多く、さらにその染色性は不安定なため、なかなか難しい染色法である。しかし、適切に染色された標本では、ニューロンやグリアの構造が鮮やかに観察される。ゴルジ鍍銀染色では、細胞質内に沈着した銀の重金属が電子線の透過を遮り、この結果、非染色部位とのコントラストが極めて良好となる。このことが、厚い切片において電子線の透過性の高低差が大きい場合に生きてくる、超高压電子顕微鏡観察に適する染色法になり得るわけである。ゴルジ鍍銀染色を習得するためにはある程度の経験、コツが必要であるし、一面においてその染色性に「偶然性」が伴うのも確かである。しかし、偶然にしても、染色がうまくいった場合には、極めて大きな情報を与えることも事実である。

我々は副腎皮質や性腺から分泌されるステロイドホルモンが脳の神経細胞の機能形態に与える影響について、様々な方法を用いて観察している⁴⁻⁶⁾。副腎皮質ステロイドホルモンであるグルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、性ステロイドホルモンである、エストロゲン、アンドロゲンなどの受容体は、脳のある種の神経細胞や神経膠細胞にも発現しており、これらの細胞においては、循環するステロイドホルモンの状況に反応して、様々な機能、形態の変動を示す。すなわち、ステロイドホルモンはある種の神経細胞や神経膠細胞の機能制御に重要な役割を果たしていることを意味する。これらのステロイドホルモンとその受容体のうち、我々は特に副腎皮質ステロイドホルモンとその受容体であるグルココルチコイド受容体に注目して、これらの脳への影響を検索している。

副腎皮質ステロイドホルモンは、脳におけるストレス応答系に重要な役割を果たしている。一連のストレス反応には、視床下部一下垂体一副腎皮質系がその中心的な役割を果たす。副腎皮質束状帯からコルチゾールが分泌されるが、これは下垂体からの ACTH の刺激を受け、さらに ACTH は視床下部室傍核の小細胞性領域に分布する CRH (corticotropin releasing hormone) 産生によってその分泌が刺激される。コルチゾールはその化学的性状が脂溶性であることから、血液脳関門において排除されず脳内に直接入ることが出来、コルチゾールに対する受容体を有する神経細胞に直接作用する。コルチゾールに対する受容体はタンパクであり、通常細胞質に分散している。コルチゾールと特異的に結合することによって、受容体は活性化され核内に移行し、DNA のホルモン応答配列 (Hormone response element; HRE) と結合し、その結果転写が進み、特定の遺伝子が発現され、細胞機能の発現、細胞構造の維持などに働くと考えられる。脳内には二種類の副腎皮質ステロイドホルモン受容体が存在する。一つはミネラルコルチコイド受容体 (Type I) であり、コルチゾールやアルドステロンと高い親和性を有する。他はグルココルチコイド受容体 (Type II) であり、コルチゾールとの親和性は Type I に比して低い親和性を示す。血中のコルチゾール値が低い状態ではミネラルコルチコイド受容体が優位に働くが、コルチゾール値が高い場合、すなわち、ストレス環境下においては、よりグルココルチコイド受容体が重要な意味をなすことになる。脳において、視床下部室傍核の CRH 産生ニューロンには豊富なグルココルチコイド受容体が発現しており、コルチゾールの直接作用を受けることがわかる。このほかに、脳の様々な領域、例えば海馬、扁桃核、大脳皮質といった辺縁系、脳幹、小脳などでもこの受容体は豊富に発現している。海馬は副腎皮質ステロイドホルモンの重要な標的的部位であり、電気生理学的にラットの海馬を刺激すると血中のコルチコステロン量の変動が生じることが知られており、また、グルココルチコイド受容体も豊富に発現しており、海馬こそが副腎皮質ステロイドホルモンの調節中枢として捉えることが出来る。従って、コルチゾール (ラットではコルチコステロン) 分泌機構は海馬一視床下部一下垂体一副腎皮質の軸によって調整されるといえる。血中コルチゾールの変動は海馬の神経細胞に様々な機能形態変化を引き起こすことが多数報告されている。また、長期間の副腎機能障害は記憶障害を引き起こすことがある。実際にラットの副腎を摘出し、コルチコステロン濃度が低下、或いは欠落した状況を作ると、錐体細胞の樹状突起の棘 spines の形状や密度が大きく変化する。樹状突起の棘の多くは、他のニューロンとのシナプスを形成しており、この変化は、神経情報伝達機能の変化を示唆するものである。ストレスは脳の反応であり、脳によってその現象が構築される。従って、この脳における副腎皮質ステロイドホルモン受容体の発現機構や機能を解明することは、すなわちストレス現象の解明にも繋がる重要な課題といえる。このストレス応答系は様々な内部環境や加齢などに

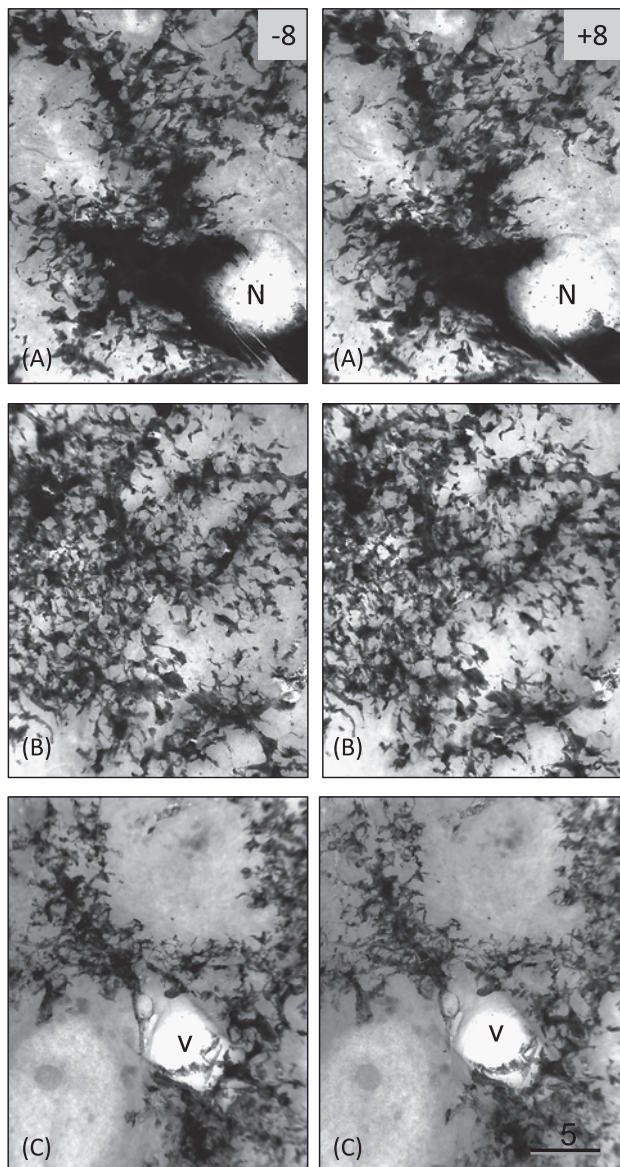


図3 超高压電子顕微鏡による、ゴルジ染色によって剖出したラット海馬CA1領域の星状グリア細胞のステレオ観察像。(A)コントロール(正常)群、(B)副腎摘出(ADX)後4週間群、(C)副腎摘出2週間+コルチコステロン補充2週間群。左列の写真は -8° に傾斜して得られた像、右列の写真は $+8^\circ$ に傾斜して得られた像。ADXによってグリア細胞の突起が発達、細かく突起の枝が広がる様子が鮮明に観察され、コルチコステロンの補充によってコントロール状態に戻る様子が観察される。N:核、v:血管 Bar=5 μ m

よって変化を示し、その際の神経細胞、神経膠細胞の形態変化は超高压電子顕微鏡で捉えると、実にダイナミックに、また詳細に観察することが出来る一例である。図3、4は、ストレス応答と密接な関連を持つ、海馬領域における星状グリア細胞、神経細胞の樹状突起とその棘(spines)の様子について、 $\pm 8^\circ$ の傾斜をかけてステレオ観察したものである。これらの細胞の機能形態変化を三次元的に捉えることは、極めて重要な情報となり、神経解剖学、神経科学の見地からも意義深いものとなる。さらに、超高压電子顕微鏡画像をより

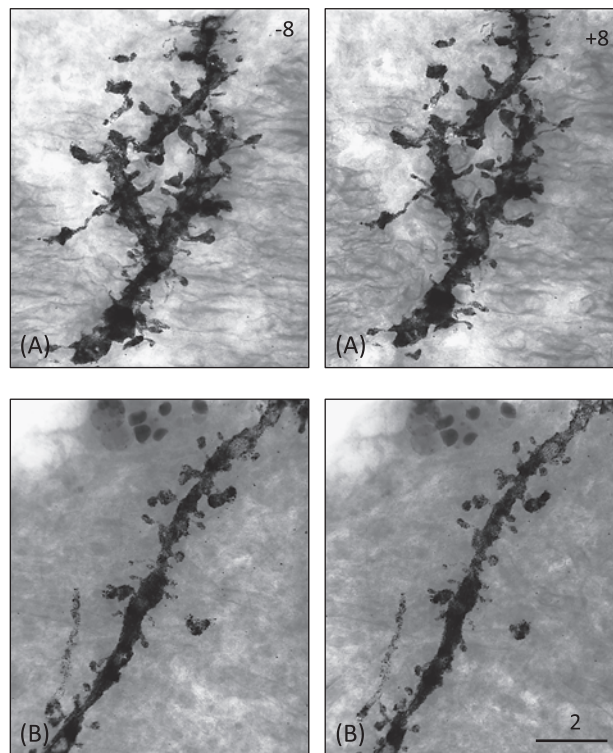


図4 超高压電子顕微鏡による、ゴルジ染色によって剖出したラット大脳皮質の神経細胞の樹状突起のステレオ像。(A)2ヶ月齢の若いラット、(B)24ヶ月齢の老齢ラット。左列の写真は -8° に傾斜して得られた像、右列の写真は $+8^\circ$ に傾斜して得られた像。2ヶ月齢の若いラットの神経細胞樹状突起ではよく発達した棘(spines)が高い密度で発達している様子が観察されるが、老齢ラットではこの棘の明らかな形状変化、密度変化が観察される。Bar=2 μ m

ダイナミックに観察するためには、超高压電子顕微鏡によるトモグラフィ観察を行い(図5)、その画像をコンピュータ処理によって三次元立体化、あるいはムービーとしてその三次元変化を観察することも有用であり、実用化が進みつつある⁷⁾。

ゴルジ鍍銀染色法の他に、免疫組織化学による反応細胞の観察がある。ただし、通常のDAB反応による反応細胞の観察は、よほどしっかりとした反応が出ていないと、コントラストを得る上で厳しいものがある。このような場合にはDAB反応の際に、ニッケルアンモニウム、塩化コバルトを加え、増感発色させる工夫を加えると、コントラストを高めることが出来る。それでも足りない場合にはさらに、金粒子増感法を用いること工夫もある。これは、いわゆる二次抗体反応をDAB/コバルト・ニッケル増感に加え、nano-gold法を組み合わせることによって、さらに銀増感して用いるものである。ただし、銀増感の条件設定は試料によって異なり、事前の条件設定のチェックが重要になる。

5. おわりに

顕微鏡観察の技術は、この20年間において飛躍的に発展し、特に共焦点レーザー顕微鏡の導入・発展は大きな成果を提

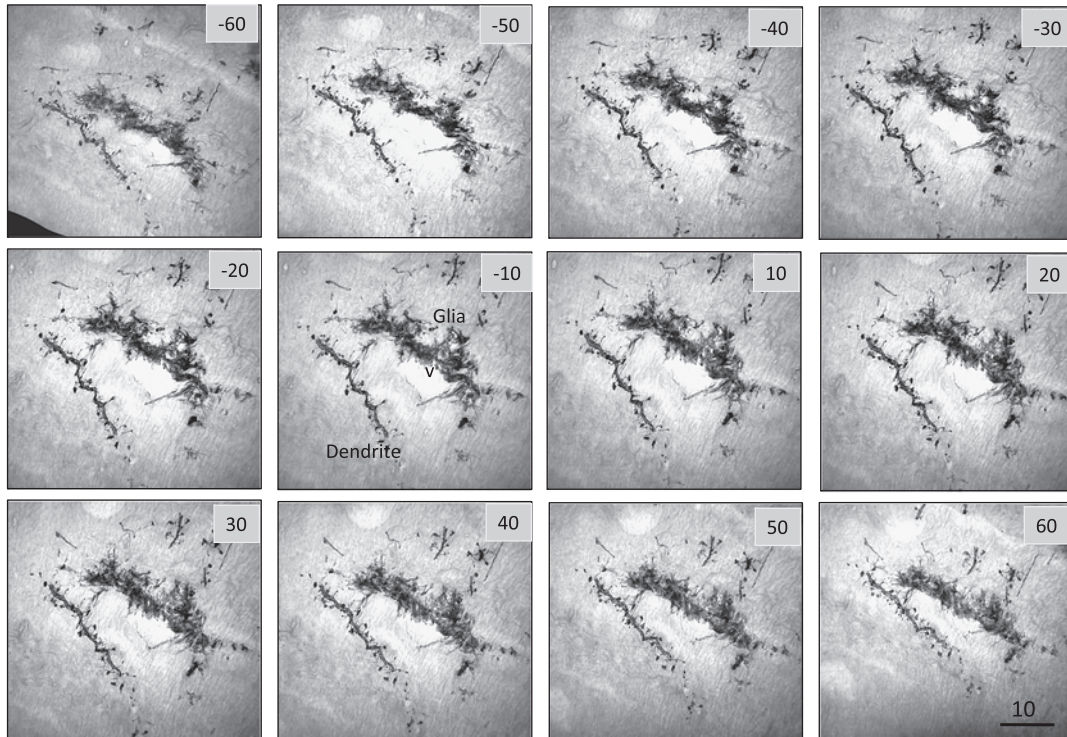


図5 超高压電子顕微鏡によるトモグラフィー像。実際には -60° ～ $+60^{\circ}$ の間で 1° ずつ傾けて、合計120枚の像を得、これをもとに立体構築へ持っていく。この像は、海馬領域における神経細胞の樹状突起 (dendrite) とその周囲にある血管 (v) を取り囲む星状グリア細胞 (Glia) のうち -60 , -50 , -40 , -30 , -20 , -10 , $+10$, $+20$, $+30$, $+40$, $+50$, $+60$ の傾斜で撮影されたものを並べた。Bar=10 μ m

供してきた。この間、いわゆる電子顕微鏡を用いる研究は、これに取って代わられる時代もあったが、しかし、研究、学問が展開する中で、改めて電子顕微鏡の役割が見直されているのも事実である。「電子顕微鏡だけ」の研究の時代はすでに去ったが、「電子顕微鏡も」利用して多角的に研究する時代となっている。分子生物学が進み、培養系や本年のノーベル化学賞受賞で話題となったGFP (green fluorescent protein) を代表とする細胞標識技術が進む中、研究者の知恵、戦略次第によって、空間解像度に関して優れた力を有する超高压電子顕微鏡がもたらす多様な研究、成果には多くの可能性が示唆されるようになってきていると思う。是非、様々なアイデアを駆使して、この大きな可能性を有する顕微鏡を活かしてほしいと願う。

謝 辞

本研究は、自然科学研究機構生理学研究所超高压電子顕微鏡共同利用実験、および文部科学省ナノテクノロジー総合支援プロジェクトとして行われているものの一部である。関係各位に心からの謝意を表します。

文 献

- 1) Arai, K. and Hama, K.: *J. Electron Microsc.*, 36, 177-195 (1987)
- 2) Hama, K. et al.: *Microsc. Res. Tech.*, 29, 357-367 (1994)
- 3) Hama, K. et al.: *J. Neurocytol.*, 33, 277-285 (2004)
- 4) Ozawa, H. et al.: *J. Neuroendocrinol.*, 183, 507-515 (2004)
- 5) Han, F. et al.: *Neurosci Res.*, 51, 371-381 (2005)
- 6) Ozawa, H.: *J. Nippon Med. Sch.*, 72, 316-325 (2005)
- 7) Nishida, T. et al.: *Acta Histochem. Cytochem.*, 40, 93-99 (2007)