

連続切片 SEM 法とゴルジ装置の 3D 構造解析への応用

Serial Section Scanning Electron Microscopy and Its Application for the Morphological Analysis of the Golgi Apparatus

甲賀 大輔, 久住 聡, 牛木 辰男

Daisuke Koga, Satoshi Kusumi and Tatsuo Ushiki

新潟大学大学院医歯学総合研究科顕微解剖学分野

要 旨 連続切片 SEM 法は、超薄連続切片を硬い基板に載せ、その切片像を走査電子顕微鏡 (SEM) で取得する技法である。この手法は、透過電子顕微鏡による連続切片法より容易であり、取束イオンビーム /SEM (FIB/SEM) のように高価で特殊な装置を用いずに、高精度な 3D 再構築像の作製が可能である。本稿では、この連続切片 SEM 法について、解説すると共に、この手法をゴルジ装置の 3D 構造解析に応用した例を紹介する。この手法は、ゴルジ装置のような空間的に複雑な形状を呈する細胞小器官の 3D 構造解析に最適である。連続切片 SEM 法を用いることで、ゴルジ装置やミトコンドリアなどの細胞小器官の 3D 構造解析の応用に期待がもてそうである。

キーワード：連続切片 SEM 法, ゴルジ装置, 3D 再構築

1. はじめに

近年、連続断層像の三次元再構築法が電子顕微鏡による生体構造解析に応用されてきて脚光をあびている。これには、取束イオンビーム (FIB) を用いたブロック面観察法 (FIB/SEM)^{1,2)} や、マイクロームを鏡体内に組み込んだ切削ブロック面観察法 (SBF/SEM)³⁾ などがある。また、樹脂包埋標本の超薄連続切片をガラスなどの硬い基板に載せ、SEM で観察した像を 3D 再構築する技法が報告されている⁴⁻⁷⁾。連続切片 SEM 法 (または Array tomography) といわれるこの技法の特徴は、①透過電子顕微鏡 (TEM) による連続切片観察法の高度なグリッド操作技術を必要とせず、比較的容易に連続切片を回収することができる、②広領域の標本観察が可能である、③試料の Z 軸方向の観察領域 (連続切片数に依存) が無限である、④観察した切片を何度でも再観察することができる、などの特徴があり、様々な点で大きな可能性を秘めたイメージング技法である。そこで本稿では、この連続切片 SEM 法をゴルジ装置の立体構造解析に応用した。

2. ゴルジ装置の染色法

連続切片 SEM 法では、切削した連続切片の反射電子 (BSE) 像を観察する。反射電子の信号強度は、標本の原子番号に依存しているので、重金属が沈着した構造体のコントラストが

あがり、SEM で容易に観察することができる。ゴルジ装置を重金属で染色する方法としては、オスミウム染色法や酵素組織化学法が知られているが、ここでは、試料の扱いが容易なオスミウム染色法を用いた。まず、麻酔した動物から素早く組織を取り出し、適度な大きさに細切する。その後、2% 四酸化オスミウム水溶液で 2 時間 (室温) 固定し、試料の入った固定瓶を 40°C に温めた水槽中で 40 時間静置する。この過程により、ゴルジ装置がオスミウムで染色される。このオスミウム染色した組織を TEM で観察すると、ゴルジ装置のシス側の数層の槽にオスミウムの沈着がみられる⁸⁾。

3. 連続切片 SEM 試料作製法

① 準超薄切片の作製

エポキシ樹脂に包埋したオスミウム染色標本の準超薄切片を、ウルトラマイクロームで切削する。その後、目的の組織構造が露出されているかを確認するため、トルイジン青染色を行い、光学顕微鏡 (光顕) で検鏡する (図 1a)。また、トルイジン青染色切片の観察により、トリミング領域の確認も行う (図 1a. 赤線で囲まれた部分)。

② トリミング

エポキシブロックを両刃カミソリを用いて台形状にトリミングする (図 1b)。この時、組織が完全に露出している部分だけをトリミングすることが大切である。また、台形の上辺と下辺を平行にすることが、連続切片を作製するために重要である。上辺と下辺を正確に平行とするために、エポキシブロックをガラスナイフもしくはトリムナイフなどを使って、ウル

〒 951-8510 新潟県新潟市中央区旭町通 1-757

TEL: 025-227-2062; FAX: 025-224-1767

2014 年 9 月 1 日受付

トラミクロトームにより仕上げる。最終的な台形のサイズは、目安として上辺 0.7 mm, 下辺 1 mm, 高さ 0.4 mm 以内になるように整形している。

③ 連続切片のリボンの作製とリボンの整列

連続切片の切削には、ダイヤモンドナイフ (Diatome Inc., Biel, Switzerland) を用い、切削スピードは 1-1.4 mm/秒に設定している。リボンの長さは、内径 7 mm のトランスファーリング (Micro Star, Tokyo, Japan) でピックアップできる長さにする (図 1c)。この場合、連続切片の枚数はおおよそ 10-15 枚となり、睫毛を使って連続切片のリボンをダイヤモンド刃から丁寧に離す。再びリボンの作製・剥離を繰り返し、4 列のリボンを順番に並べることで、約 40-50 枚程度の切片が整列することになる (図 1d)。

④ 切片のピックアップ

連続切片のリボンを、トランスファーリングでピックアップする (図 1e)。整列したリボンの列をなるべく乱さないように、トランスファーリングを静かにナイフポート中に浸水させる。連続切片のリボンの下にトランスファーリングを潜らせ、列を整えた後に、一気に引き上げると比較的上手くピックアップすることができる。

⑤ 切片の移動

トランスファーリングにすくい取った連続切片のリボンを、スライドガラス上に静置する (図 1f)。私たちは、MAS コート付スライドガラス (Matsunami Glass Ind., Ltd, Osaka,

Japan) を使用しているが、無コートのスライドでも問題はない。スライドガラスを用いることで、SEM 観察前に、切片を光顕で観察することが容易となる。また、スライドガラスは導電性がないため、後に導電処理を施す必要があるが、切片を貼り付ける基板として導電性シリコン板を用いることもある⁵⁾。

⑥ 切片の貼り付け

切片が載ったスライドガラスをホットプレート上に置く (図 1g)。この時、トランスファーリングも一緒に載せたまま移動する。ホットプレートは、予め 60°C に設定しておき、切片を完全に接着させるには、30 分以上静置することが望ましい。このように③~⑦までの一連の過程を数回繰り返すことで、必要枚数の連続切片を採取する。

⑦ ウラン・鉛染色

連続切片 SEM 法では、試料を破壊的に観察する FIB/SEM や SBF/SEM とは異なり、観察試料を連続切片として残すため、その切片を採取後に重金属染色することができる。すなわち、連続切片 SEM 法では、従来の TEM 試料作製法と同じ条件で試料を染色し、観察することができる。

連続切片が載ったスライドガラス上に、1%酢酸ウランを数滴 (約 50 μ l) 垂らし、10 分間染色する (図 1h)。その後、蒸留水で数回洗浄し、Reynolds の鉛液で 5 分間染色する (図 1i)。最後に蒸留水で数回洗浄し、ブローアーなどを用いて切片に空気を吹きかけ、素早く乾燥させる。

⑧ 載台と金属コーティング

切片が貼り付いたスライドガラスを SEM 試料台に載台するため、ダイヤモンドペンで約 1 cm \times 1 cm の大きさに傷つけ、注意しながら手で割る。その後、カーボンテープを用いて、スライドを SEM 試料台に貼り付ける (図 1j)。切片をスライドガラスに貼り付けただけでは、SEM 観察中に帯電現象 (チャージアップ) が生じてしまう。これを防ぐために、試料に導電性をもたせる必要がある。帯電防止のためには、カーボン蒸着による処理が使われていることが多いが⁶⁾、私たちは、白金パラジウムによるスパッタコーティングを行っている。コーティングの厚さは、1 nm 以下に設定している (図 1k)。

⑨ SEM 観察

最後に、導電処理した試料を SEM 観察する。私たちは、連続切片を熱電子銃型 SEM (SU-3500, Hitachi) により、加速電圧 7 kV の条件で観察し、反射電子像を撮影している (図 1l)。

4. 超薄切片の反射電子像

図 2a は、超薄切片の反射電子像であり、図 2b は、その白黒反転像である。反射電子像を白黒反転することで、TEM 像のようなコントラストを得ることができる。オスミウム染色すると、ゴルジ装置のシス槽にオスミウムの沈着がみられるため、反射電子像の信号強度が強く観察される (図 2 矢印)。そのほか、ウラン・鉛の二重染色を施すことで、核や分泌果粒などの細胞小器官も観察することができる。

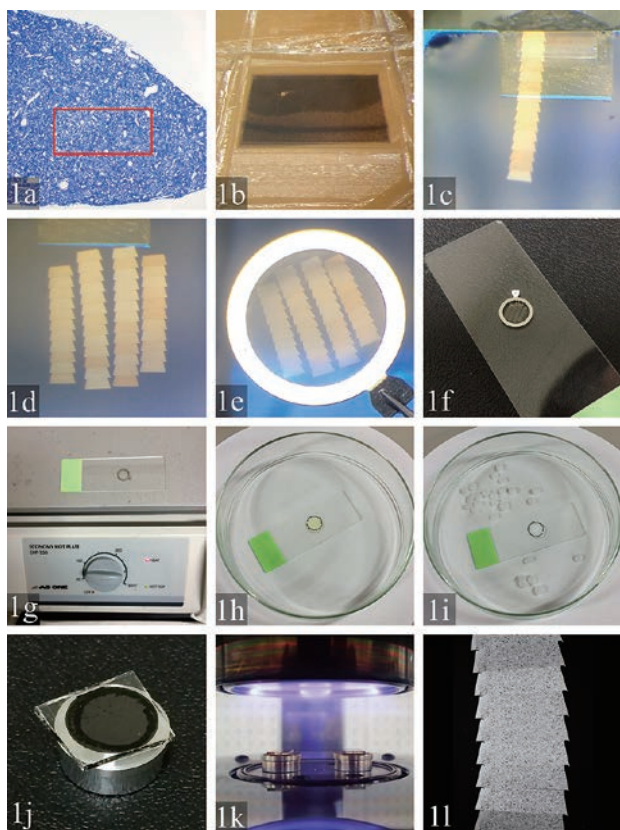


図 1 連続切片 SEM 法の試料作製法の流れ

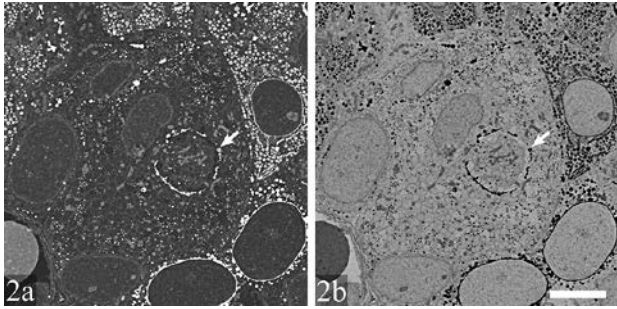


図2 連続切片の反射電子像
スケールバー：5 μm

5. 3D 再構築法

① 観察領域の選択

例えば、300枚の連続切片を作製した場合、連続切片の真中に位置する150番目の切片前後から観察すると都合が良い。この切片観察で、3D再構築を行いたい領域を決める。目的がゴルジ装置の場合、この小器官がちょうど中央部で薄切されているような細胞を選ぶ（図3a。赤線で囲まれた領域）。

② 連続切片の撮影

観察領域を決定した後、そこから1番目の切片に向かって対象構造が無くなるまで観察・撮影する。次に、300番目の切片に向かって観察・撮影を繰り返す（図3b）。

③ アライメント調節

連続撮影した像を3Dソフトウェア（Amira 5.5, VSG-FEI, Bordeaux, France）に読み込む。Align Slices ツールを用いて、連続切片像の自動整列を行い、目視で確認後、必要に応じて手動でアライメントの微調節を行う（図3c）。アライメントの調節が終わった連続切片像は、TIFF イメージとして保存する。図3bの赤線で囲まれた領域は、連続切片のアライメント調節後の像を示す。

④ セグメンテーション

アライメントの調節を終えた画像を画像処理ソフトウェア（Photoshop CS6, Adobe Systems Inc., California, USA）に読み込む。次に、3D再構築する構造体、すなわち、ゴルジ装置（図3d）、核（図3e）、細胞質（図3f）について、領域選択を行い、その選択範囲をAlpha channel に記録する。この過程を連続切片の枚数分繰り返す、画像データをTIFF イメージとして保存する。

⑤ スタック

目的の構造にセグメンテーションを施した連続画像をAmiraソフトウェアに再び読み込む（図3g）。保存したAlpha channel のデータ（ゴルジ装置、核、細胞質）を基にサーフェースレンダリング法により3Dモデルを作製する（図3h）。

6. 連続切片 SEM 法によるゴルジ装置の3D構造解析

図4a-4lは、下垂体前葉性腺刺激ホルモン（GTH）産生細胞の連続切片像を示した。ゴルジ装置にオスミウムの沈着が

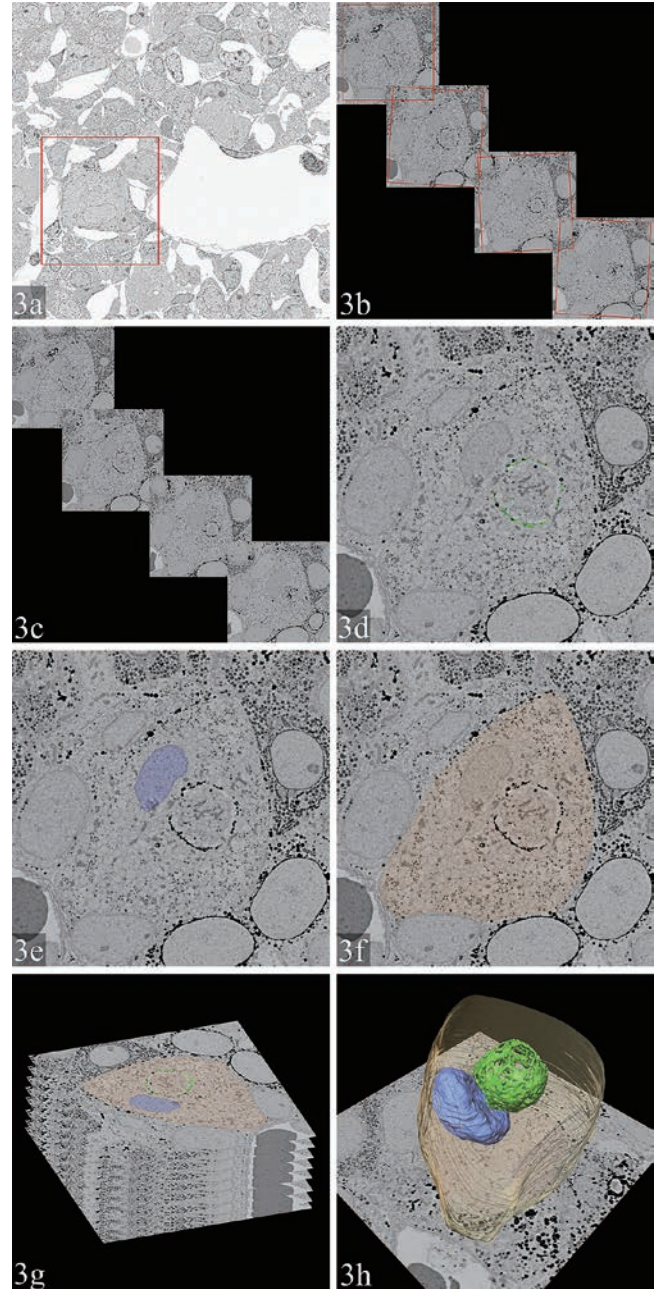


図3 連続切片像の3D再構築の流れ

みられる（矢印）。一枚の超薄切片では、GTH細胞のゴルジ装置はリング状に観察される。図4mのステレオペア像は、GTH細胞のゴルジ装置（緑）、核（青）、細胞質（茶）を3D再構築した像である。ゴルジ装置が細胞の中心部に位置していることがわかる。核はゴルジ装置に押し込まれ細胞質の端に位置している。また、3D再構築像をステレオ観察することで、GTH細胞のゴルジ装置が球体であることが良く理解できる（図4n）。この3D再構築像は、オスミウム染色により染色されたゴルジ装置のシス槽である。Rambourgらは、オスミウム染色もしくは、酵素組織化学染色したゴルジ装置の厚切り切片を超高圧電顕で観察し、ステレオ撮影することで、様々

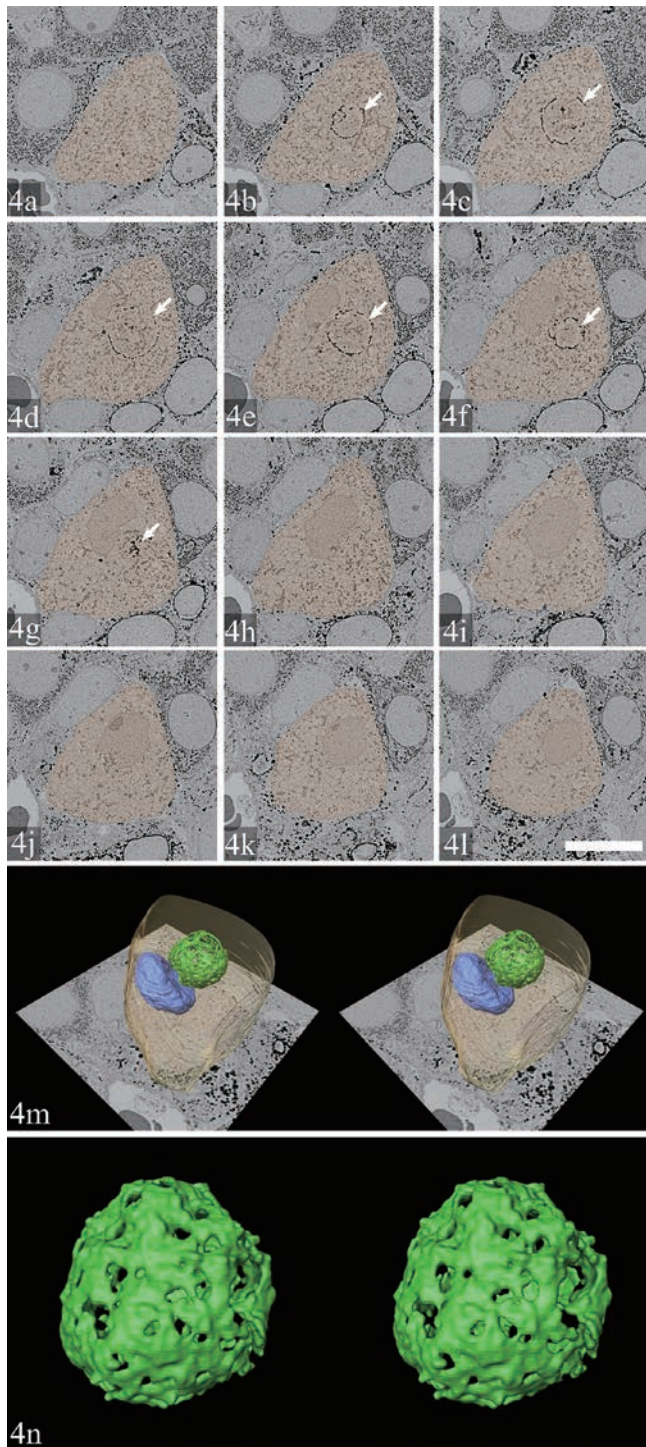


図4 連続切片SEM法によるゴルジ装置の3D構造解析
スケールバー：10 μm

な細胞のゴルジ装置の全体像を報告している^{9,10)}。しかし、数 μm の厚切り切片の観察では、その切片の厚みの範囲内にゴルジ装置を完全に捉えることはできず、ゴルジ装置の全体像を完全にイメージングできない。一方、連続切片SEM法では、ゴルジ装置全体のイメージングが可能となり、これまで謎の多かった様々な細胞のゴルジ装置の全体像を立体的に解析することができる。

7. 連続切片SEM法の利点

連続切片SEM法について、いくつかの利点を以下に示す。

① 切片の回収

TEMによる従来の連続切片法では、連続切片のリボンを単孔グリッドに回収しなければならない。このグリッド操作は、熟練した高度な技術が必要であり、未熟な操作では切片を傷つけたり、失うリスクが高い。一方、連続切片SEM法では、連続切片をスライドガラスに貼り付けるため、グリッド操作の必要がない。特に、私たちが行っているトランファーリングによる切片の回収法は、比較的容易で、切片へのダメージが少ない。

② 試料の保存と再観察

FIB/SEMやSBF/SEMでは、エポキシ樹脂に包埋した試料の表面を、収束イオンビームもしくは、ダイヤモンドナイフにより取り除き、新たに露出した面をSEM観察するので、繰り返し試料を観察することができない。しかし、連続切片SEM法では、連続切片のリボンをスライドガラス上に貼り付けるため、半永久的な保存が可能になり、試料を再観察することで、同じ切片で興味ある領域を何度も観察・撮影ができる。

③ SEM観察領域の設定

トリミングするエポブロックの大きさ、すなわちSEM観察領域を自由に決めることができる。試料によっては広範囲の領域を網羅したほうが良い場合と、狭い範囲で十分である場合もあるため、観察試料の条件に合ったトリミングを行うことができる。当然のことであるが、大きくトリミングした場合、一度に回収できる連続切片の枚数は少なくなることを考慮しなければいけない。また、z軸観察領域は、連続切片の回収枚数に依存するため、連続切片の枚数が多いほど、観察できる深さ情報も増えることになる。

④ 切片のダメージ

TEMの連続切片法では、グリッドに載った切片を観察するため、電子線による切片の歪み（伸縮）や損傷などが大きな問題となる。一方、連続切片SEM法では、連続切片をスライドガラスなどの硬い基板に貼り付け、導電処理もできるため、電子線による切片の損傷を最小限に抑えることができる。

⑤ ウラン・鉛染色

ガラス基板に載せた切片は、ウラン・鉛の重金属染色を施すことができる。これは、一般的なTEM試料作製法と変わらない条件で、SEM観察が可能となることを意味している。また、過去にTEM観察標本として樹脂に包埋した試料の観察も可能となる。特に大きな利点としては、FIB/SEMやSBF/SEMの試料作製法で常用されている特殊な固定・染色法（オスミウム・チオカルボヒドライド・オスミウム；OTO法¹¹⁾）を施さなくても、SEM観察が可能なことである。

⑥ 切片の導電処理

スライドガラスに載った切片を直接観察すると、チャージアップ現象により、像にドリフトがみられたり、切片が電子

線により熱ダメージを受ける。そこで、金属コーティングやカーボンコートなどの導電処理を施すことで、これらの問題を解決することができる。また OTO 染色法は、FIB/SEM や SBF/SEM において、試料の導電性を増すためにも重要な染色法であるが、連続切片 SEM 法では、切片に導電処理を施すことができるので、試料に OTO 染色を施す必要がない。

⑦ 免疫組織化学染色（免疫染色）の可能性

連続切片 SEM 法では、樹脂切片をスライドガラスに貼り付けるため、この切片に免疫染色を施すことができる。Micheva と Smith らは、LR White の連続切片を蛍光免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察・撮影した像の 3D 再構築に成功している⁴⁾。今後は、LR White 樹脂を連続切片 SEM 法に導入し、蛍光免疫染色像と SEM による 3D 再構築像との相関顕微鏡観察法 (correlative microscopy) に応用することも期待できる。

8. 連続切片 SEM 法の欠点

xy 分解能は使用する装置の分解能に依存するが、この方法では連続切片を用いるので、z 軸分解能は切片の厚みに依存し、FIB/SEM に劣ることが多い。FIB/SEM では、切削ピッチが 1 ステップ 10 nm であるのに対し、連続切片 SEM 法では、安定した連続切片を作製するには、切片の厚さ (z 軸分解能) は、70–100 nm が最善である。また、連続切片 SEM 法は、撮影した像のアライメント調節を必ず行わなければならない点も欠点である。正確なアライメント作業は、後に出来上がる再構築像の良否に大きく関わってくる。

9. おわりに

本稿では、連続切片 SEM 法について、切片作製法から観察・撮影、3D 再構築法までの一連の流れを紹介した。この手法は、TEM による連続切片法より容易であり、FIB/SEM や SBF/SEM のように高価で特殊な装置を用いずに、それと同等で高精度な 3D 再構築像の作製が可能である。特に、この連続切片 SEM 法は、ゴルジ装置の 3D 形態学的解析に有効であり、これまでイメージングが困難であったゴルジ装置の全体像を解明することが期待できる。

文 献

- 1) Ohta, K., Sadayama, S., Togo, A., Higashi, R., Tanoue, R. and Nakamura K.: *Micron*, **43**, 612–620 (2012)
- 2) Wanner, G., Schäfer, T. and Lütz-Meindl, U.: *J. Struct. Biol.*, **184**, 203–211 (2013)
- 3) Denk, W. and Horstmann, H.: *PLoS Biol.*, **2**, 1900–1909 (2004)
- 4) Micheva, K.D. and Smith, S.J.: *Neuron*, **55**, 25–36 (2007)
- 5) Horstmann, H., Körber, C., Sätzler, K., Aydin, D. and Kuner T.: *PLoS One.*, **7**, e35172 (2012)
- 6) Reichelt, M., Joubert, L., Perrino, J., Koh, A.L., Phanwar, I. and Arvin A.M.: *PLoS Pathog.*, **8**, e1002740 (2012)
- 7) Wacker, I. and Schroeder, R.R.: *J. Microsc.*, **252**, 93–99 (2013)
- 8) Friend, D.S. and Murray, M.J.: *Am. J. Anat.*, **117**, 135–150 (1965)
- 9) Rambourg, A., Clermont, Y. and Marraud, A.: *Am. J. Anat.*, **140**, 27–46 (1974)
- 10) Rambourg, A. and Clermont, Y.: *Eur. J. Cell Biol.*, **51**, 189–200 (1990)
- 11) Deerinck, T., Bushong, E., Lev-Ram, V., Shu, X., Tsien, R. and Ellisman, M.: *Microsc. Microanal.*, **16**, 1138–1139 (2010)