

TEM, FIB/SEM, DiK-SEM を使った神経組織の電子顕微鏡連続切片作製

窪田芳之 (生理学研究所・大脳神経回路論研究部門)

我々の高次脳活動は、その多くが大脳皮質の活動によって行われている。その大脳皮質の活動の基本構造であるマイクロサーキットの詳細を明らかにする事で、我々の脳の活動様式を知る事が出来る。マイクロサーキットを明らかにするために、コネクトミクス解析が有効な手段として注目を浴びている。それを念頭におき、従来のTEM連続切片観察法や、ダイヤモンドナイフ切削型SEM (DiK/SEM) や FIB/SEM 等の自動連続画像取得できるタイプの電子顕微鏡を使い、脳組織から一気に大容量のスタック画像を取得し画像解析する方法を簡単に紹介する。

まず、従来のTEM連続切片観察法であるが、シナプス構造等の神経細胞の微細な形態を計測する上で大変重要な方法である。ただし、連続した超薄切片を作製するのは、熟練の技を必要とする為、十分にトレーニングを受けた専門家のみが使いこなす技法である。また、専門家といえども、一連の作業や解析に多大な時間を要する事が大きな障害となり広範に普及するには至らなかった。その大きな壁を乗り越えて、近年、普及しつつある技法が、ブロックフェイスSEMによる連続切片写真をオートマチックで獲得する方法である。DiK/SEM や FIB/SEM 等の自動連続画像取得できるタイプの電子顕微鏡が徐々に普及し始めている。従来の方法に比べると、格段に操作方法が簡便で、しかも一気に大量の画像を自動取得する事が出来るという大きなメリットがある。

我々は、FIB/SEM を使って、ピクセルサイズ 5nm、切片厚 10nm で電子顕微鏡画像を連続で撮影し、神経細胞の樹状突起の細胞骨格である微小管の分布を解析したところ以下の事がわかった (参考文献、図参照)。

(a) 樹状突起の太さは、樹状突起を構成する微小管の数と相関している

(b) 樹状突起の分岐部で、親樹状突起にある微小管は、2つの娘樹状突起のどちらかに侵入し、分岐直前と直後の微小管の数は同じになる。その為、分岐部で断面積が保存される。

FIB/SEM の特徴であるが、切片の厚さは FIB で制御されるため、最薄で 2.5nm 厚まで薄くする事ができる為、Z 軸方向の解像度が他のシステムよりも格段に良い。ただし、画像の獲得面積が比較的狭い事 (4k×4k サイズの画像) と、画像取得は 4 分に 1 枚程度と、比較的遅い事である。

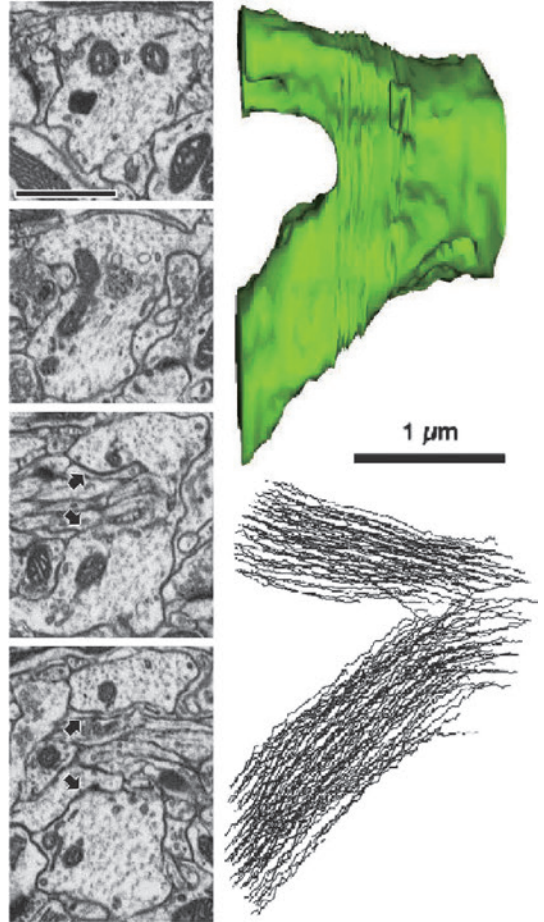


図 樹状突起内部の微小管の分布 FIB/SEM による観察

左：樹状突起分岐部の 300 nm 間隔の連続電顕画像
scale bar : 1 μm

右上：その分岐部の 3 次元再構築像

右下：その樹状突起内部の微小管の走行

一方で、DiK/SEM の特徴であるが、画像の獲得面積が比較的広い (16k×16k サイズの画像) 事、画像獲得時間が比較的早い事 (30 秒毎に 1 枚) 等、大きなメリットがある。ただし、ダイヤモンドナイフで切片を切り出すため、その厚みは 20-25nm 厚が精一杯で、それより薄い切片を切り出す事は難しい。

本発表では、以上のように、上述の 3 種類の方法の長所短所を出来るだけわかりやすく事例をあげつつ紹介した。

利益相反 なし

1. Kubota Y et al: Conserved properties of dendritic trees in four cortical interneuron subtypes. *Scientific Reports* **1**: 89, 2011 doi:10.1038/srep00089

FIB/SEM トモグラフィー法によるミトコンドリアクリステの3次元的構造解析

太田啓介 (久留米大学医学部解剖学)

我々はミトコンドリア内の3次元的全膜構造を理解するため、高分解能FIB/SEM トモグラフィーを用いた解析を行っている。この手法は、ミトコンドリア全体の膜構造を nm レベルで解析できる唯一の手法であり、これまでに内膜からクリステが立ち上がる部分が基本的に全てチューブ状 (クリステジャンクション) であることを明らかにしてきた [1]。ミトコンドリアは細胞内で分裂融合を繰り返しその品質管理を行っていることが知られており、その動的な制御機構の解明は細胞機能の理解のために重要であると考えられる。そこで、我々は現在このFIB/SEM トモグラフィー技術を応用することで、形態学的側面からその機構解明に向けて取り組んでいる。

ミトコンドリアの分裂は最終的にダイナミン様分子 Drp1 のミトコンドリアへの局在により行われると考えられている。また近年ミトコンドリア DNA は分裂と融合の過程に連動して挙動することが明らかになり、ミトコンドリア DNA がランダムに存在するのではなく、分裂に伴い何らかの制御を受けていることが予想されている。つまり、ミトコンドリア外での Drp1 の挙動とミトコンドリア内の DNA の動きを連動させる機構の存在が示唆されている。ミトコンドリア DNA を含む核様体構造はクリステに付着している可能性が指摘されており、現在、分裂の過程ではクリステの動きの制御によって分裂と核様体の挙動が同調しているのではないかとモデルが提唱されている段階である。

これらの分子機構については明らかになりつつあるものの、従来の顕微鏡法を用いてミトコンドリア内部の詳細な3次元的構造を解析することが非常に困難であったため、その形態学的な理解は進んでいない。透過型電子顕微鏡を用いればクリステ構造などを nm レベルの分解能で観察する事は可能であるがその情報は2次元的なものに限られている。積層するクリステ間の距離は30nm程度であるので、この広がりを把握するには20nm程度の深さ方向の分解能が必要となる。これまでに連続超薄切片法による解析も試みられてきたが、深さ方向に100nm以下の空間分解能を得るこ

とは困難であった。一方、電子線トモグラフィー法というX線CTのような方法で空間分解能10nm以下で解析する方法もあるが、試料の厚さが1 μ m以下という制約があり、やはりミトコンドリア全体の構築を知ることは出来なかった。

FIB/SEM トモグラフィーは、収束イオンビーム (FIB) を用いて試料表面を数 nm 削り、それによって得られた観察面を SEM を用いて観察するというサイクルを自動で繰り返すことで試料の内部構造を3次元的に解析する手法である。今回我々はラット肝細胞6 μ m角の領域を水平分解能12nm、垂直分解能20nmで再構築し、ミトコンドリアとその周辺の構造について解析を行った。特にミトコンドリアの分裂にはその周囲でミトコンドリアに接触する小胞体 (MAM) が関連することが報告されているため、クリステだけでなくMAMの構造およびミトコンドリア全体におけるこれらの分布について注目し解析を行った。その結果、今回我々はミトコンドリア上におけるMAMの空間的分布を捕らえることに初めて成功した。MAMにはミトコンドリア外膜と小胞体が癒合して観察されるものと、酵母ERMES様の架橋構造として認識される二種の構造が観察され、その分布はミトコンドリアにより異なり、場合によって前者がミトコンドリア表面の70%近くを被う様子が確認された。また分裂に移行する可能性の高い「くびれ」領域においても、多数のMAMの存在を確認することが出来た。しかし今回の電顕レベルでの解析では、現在のところ酵母で観察されるようなER-tubleと呼ばれる小胞体構造が「くびれ」を取り囲むような構造は確認できなかった。ほ乳類細胞ではER-tubleの存在が不確かであったことから、今回の結果は光学顕微鏡レベルの結果を補強する所見と考えられる。一方、核様体については現在の染色法がDNAに対する特異性を持たないため、そのままでは明確な分布を示す事はできなかった。そこで我々は、免疫組織化学的手法を用いて作製した試料をFIB/SEM トモグラフィーを用いて解析することでミトコンドリア核様体の分布を描出した。その結果、核様体タンパクTFAM陽性の球状領域が確認され、これらは主にミトコンドリアの端部に局在する傾向を示していた。

これらの結果はFIB/SEM トモグラフィー法が、ミトコンドリアの分裂機構を解析する強力なツールとなる事を示しており、免疫組織化学、遺伝的ラベルとの組み合わせにより、さらなる機能解明につながるものと期待している。

利益相反：なし

1. Ohta K et al: Beam deceleration for block-face scanning electron microscopy of embedded biological tissue. *Micron* **43**: 612–620, 2012

SBF-SEM for ultrastructural analyses of physiology and pathology of the nervous system

大野伸彦¹, Haiyan Lu², Richard M. Ransohoff², Bruce D. Trapp³, 大野伸一¹ (¹山梨大学大学院医学工学総合研究部解剖学講座分子組織学教室, ²Neuroinflammation Research Center, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH, ³Department of Neurosciences, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH)

構造の連続性や複雑な細胞形態などを解析するために従来から行われてきた3次元超微細形態学的解析においては、透過型電子顕微鏡を用いた連続切片観察が行われてきた。しかしこうした手法は多大な労力と時間が必要であり、また技術的にも困難であった。一方で最近、走査型電子顕微鏡を用いて樹脂に包埋された生物組織を観察する生体3次元微細構造解析法が発展してきた。そのうちの一つである Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM) は、数10–数100 μ mに及ぶ比較的広範囲の領域から、数nm程度の解像度で、透過型電子顕微鏡による連続切片観察に類似した画像を比較的迅速に取得できる手法である。SBF-SEMでは組み込み式マイクロームによる表層切削とSEMによる試料の断面観察とを交互に反復することで、連続画像の取得を行う。こうした新しい3次元微細構造解析の手法を用いることで、従来の連続切片の透過型電子顕微鏡観察に代わり、細胞やオルガネラの形態や分布の正確な解析がより簡便に、短時間で行うことが可能になると期待されている。

実際、こうしたSEMによる3次元微細構造解析のアプローチは様々な細胞やオルガネラの解析に応用されてきている。例えば、中枢神経系の有髄軸索を観察することで、軸索のエネルギー産生を担うミトコンドリアは軸索内においてむしろランビエ絞輪と呼ばれる部位以外の領域(絞輪間部)に多く、また絞輪部では大きくばらつく傾向があることがわかった。その後の小脳スライス培養を用いたライブイメージング解析から、Na⁺-K⁺ ATPaseが多く分布する絞輪間部には恒常的にミトコンドリアが存在し、絞輪部には軸索の電氣的活動に伴って輸送されているミトコンドリアが停止、集積することがわかった。さらにSBF-SEMをマウス中枢神経系における脱髄(病的な髄鞘の

喪失)モデルの解析に応用することで、脱髄に伴ってミトコンドリアの数と長さが増加し、軸索ミトコンドリアの総体積が増加することがわかった。さらにミトコンドリアと微小管の連結に関わる神経特異的分子である Syntaphilin を遺伝的に欠損したマウスの解析にSBF-SEMを用いることで、脱髄に伴う軸索ミトコンドリアの体積増加にミトコンドリアと細胞骨格の相互作用が重要な役割を果たしている可能性が示された。

またこうした手法を特定の分子の標識と組み合わせる方法も開発されてきている。例えばマイクログリアおよびマクロファージのマーカである Iba1 に対する包埋前免疫染色法をSBF-SEM観察と組み合わせることで、免疫反応産物を細胞の表層部に検出することができ、その結果、特定の分子を発現する細胞の3次元微細形態を詳細に検討することができた。さらにこのアプローチを応用することで、中枢神経系脱髄病変において単球由来もしくはマイクログリア由来マクロファージの形態学的特徴を、3次元的に比較した。単球由来マクロファージにRFPを、またマイクログリア由来マクロファージGFPを発現するマウスを用いて炎症性脱髄モデルを作製し、その脊髄における脱髄病変においてRFPもしくはGFPに対する包埋前免疫染色を行った後、試料作製を行ってSBF-SEMを用いて観察した。その結果、単球由来マクロファージとマイクログリア由来マクロファージが異なる核形態を示し、また単球由来マクロファージが脱髄病変において、脱髄を引き起こす主要な役割を果たしている可能性が示唆された。

SBF-SEMによる観察の際には強い電子染色を施す特殊な方法を用いて試料を作製する必要があるものの、従来から観察されてきた多くの細胞組織に対して応用が可能な手法であることから、これまでの顕微鏡観察では得ることが困難であった情報を取得するアプローチとして、広く用いられていくと考えられる。

利益相反：なし

二重免疫標本における共焦点レーザー顕微鏡とFIB-SEMのCorrelative 3次元再構築法

蘭村貴弘(金沢医科大学医学部解剖学第二講座)

2004年にDenkらによって発表されたシリアルブロックフェイス走査電子顕微鏡(SBF-SEM)イメージング法は、走査電子顕微鏡のチャンパー内にウルトラマイクロームと試料ブロックを内蔵できる様に改良し、チャンパー内でブロック表面を薄く削り取ったのち、ブロック表面に電子を照射し、その反射電子から透過電子顕微鏡像に近い像

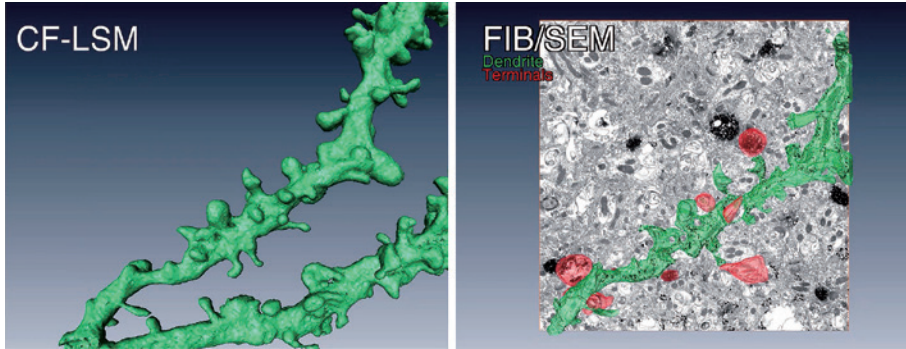


図 同一標本で共焦点レーザー顕微鏡と FIB-SEM でそれぞれ三次元再構築した線条体中型有棘神経細胞の樹状突起

を容易に取得できる画期的な方法として神経組織等の観察を中心に広まりつつある。しかも、この行程を自動で連続的に行うことで、これまで極めて高い技術と膨大な時間を必要としていた連続超薄切で得られる像と同等かそれ以上の連続画像を、ほんの数時間で得られることが、この手法の最も有利な点として挙げられる。

さらに近年、この SBF-SEM イメージング法に近い手法として、ダイヤモンドナイフではなく、集束イオンビームを用いて試料を切削し、同様の画像を取得する FIB-SEM (Focused Ion beam Scanning Electron Microscope) Tomography 法も注目されている。この FIB-SEM Tomography 法は、SBF-SEM イメージング法に比べて、いくぶん速度が遅く、切削領域が狭い反面、最少で 3 nm という、従来よりも 1 桁小さい緻密な切削が可能のため、より高い空間解像度を得ることができることと、作業中の帯電が少なく SBF-SEM よりも電子染色が従来のサンプル調製に近いという利点を持つ。

この連続超薄切に相当する作業を自動化したこれらの方法を利用することで、これまで共焦点レーザー顕微鏡で連続的に取得していた免疫染色標本の三次元スタックとほぼ同等スケール、いわゆるメゾスケールでの連続電子顕微鏡像を得られることに我々は注目し、蛍光標識したラット脳標本を、最初に共焦点レーザー顕微鏡で撮影し、その後、その試料を、二重免疫電子顕微鏡用に試料作製して、FIB-SEM Tomography 法を用いることで、共焦点レーザー顕微鏡で撮影した部位と全く同じ部位を連続透過電子顕微鏡像として取得し、それぞれを三次元再構築することを試みた。以前から我々は線条体の中型有棘神経細胞に、大

脳皮質や視床から入力する興奮性終末を定量的に解析してきたが、これまで共焦点レーザー顕微鏡による近接 (apposition) レベルでの解析にとどまっていた。共焦点レーザー顕微鏡によって近接と判断したものの中で、どの程度、実際にシナプスを形成しているかは、連続透過電子顕微鏡像で、なおかつ高い空間解像度を持つ 3 次元像でなければ定量解析が難しく、この方法はまさに我々が探し求めていた新しいテクニックであったと言える。しかし、実際に共焦点レーザー顕微鏡で撮影したわずか 25 μ m 四方の領域を正確に切り出して、別の機械である FIB-SEM チャンバー内にその試料を移動した上で、その非常に小さな目標物の含まれた全く同じ部位を Correlative に観察することは、必ずしも容易ではなく、事前に光学顕微鏡下で何度も写真撮影した上でブロック表面に浅い刻印などを入れる工夫などを経て、最終的に正確な撮影位置を割り出すことが可能となった。

FIB-SEM Tomography 法では、これまで 50nm 程度が限界とされていた超薄切の厚みを 5nm 厚相当で取得することができることから、得られた三次元透過電子顕微鏡像を、XZ、YZ、または任意の断面で、XY 断面と比較して遜色ない高解像度で観察でき、従来の透過電子顕微鏡のテクニックでは観察が難しかった XY 平面にほぼ平行なシナプスをも検出することも可能となり、視床から線条体の中型有棘神経細胞に入力する軸索終末の共焦点レーザー顕微鏡レベルで近接と判断したものの中で、6~7 割が実際にシナプスを形成していたことも確認することができた。

このように、FIB-SEM Tomography 法と共焦点レーザー顕微鏡を組み合わせた手法は、これまで多くの時間と、肉体的、精神的な労力をかけて

行ってきた多重免疫電子顕微鏡の三次元的解析を、容易にまた正確に行うことで、共焦点レーザー顕微鏡画像だけでは明確に示せなかった対象物をはるかに高い分解能で検証できるようになった。未だ非常に新しい手法および機器であるため、コスト面や画像取得速度等、改善していくべき点も存在するが、この手法が広まっていく中で数年以内に改善され、多くの問題点は解決していくことが予想される。特に、FIB-SEM Tomography法は軟組織だけでは無く、硬組織、金属なども同様の薄さで切削が可能のため、今後、様々な生体組織の形態解析においても大いに貢献するものと考えられる。

利益相反：なし

1. Sonomura et al: *Frontiers in Neural Circuits* 7 (26): 1-7, 2013

自動連続切片回収機 ATUM を用いた神経回路解析

岩崎広英, 岡部繁男 (東京大学大学院医学系研究科神経細胞生物学分野)

脳は膨大な数の神経細胞から構成され、それらがシナプスを介して結合することで神経回路を形成し、多彩な脳機能を実現している。電気機器の動作原理について理解するためには配線図が重要な手がかりとなるように、脳の「配線図」、すなわち個々の神経細胞の結合様式を網羅的に記載することは、脳の機能を回路レベルで理解する上で重要な手がかりとなるものと思われる。このような観点から、神経回路の網羅的解析(コネクトーム)を目的とするプロジェクトが近年、全世界的に進められつつある。例えばアメリカでは2014年よりBRAIN initiative がスタートした。BRAIN initiative の最終目的は脳の機能レベルでの結合様式の解明であるが、機能レベルでの結合様式を明らかにするためには個々の神経細胞の物理的な結合様式の情報が重要となる。

シナプスは微細な構造であり、例えばシナプス間隙は約25nm、シナプス小胞の直径は約40nmである。従って光学顕微鏡では分解能の観点から詳細な観察は不可能であり電子顕微鏡の利用が必要となる。一方で神経細胞は長い突起を伸ばし比較的離れた神経細胞ともシナプスを形成することから光学顕微鏡による広域観察が必要となる。従って神経回路の網羅的解析には電子顕微鏡技術と光学顕微鏡技術の各々の長所を活かし、それらを融合する技術の創出が重要である。

近年、このような目的のための技術開発の進展は目覚ましく、とくに電子顕微鏡による自動画像

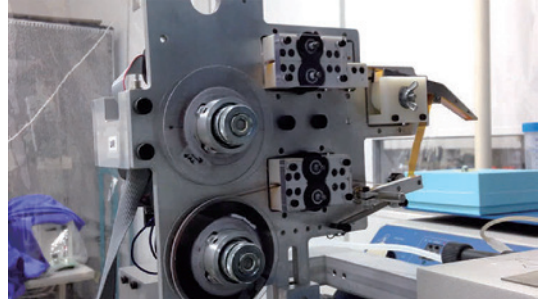


図 ATUM の構造

取得・三次元再構築法については種々の手法が開発されている。例えば SBF (Serial Block Face)-SEM [1] や FIB (Focused Ion Beam) -SEM はブロックの表面を削り取っては新たに表出する面を走査型電子顕微鏡で画像取得し、このステップを繰り返すことにより試料の三次元再構築像を得る。

これに対し ATUM (Automated Tape-collecting UltraMicrotome) はウルトラミクロトームで作製された超薄切片をプラスチックテープの上に自動回収する装置であり、Harvard 大学の Jeff Lichtman 研究室で開発された。ATUM はウルトラミクロトームに取り付けたダイヤモンドナイフで超薄切片を作製し、ベルトコンベアの要領でプラスチックテープの上に切片を自動回収していく [2]。切片の載ったプラスチックテープは適当な長さで切断され、シリコンウエハなどの上に貼り付けられて走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscopy : SEM) で画像取得に供される。

SBF-SEM や FIB-SEM では一度観察した試料は削り取られてしまうため、同じ試料を複数回観察することはできない。これに対し ATUM では、試料がテープ上に残ることから、同じ試料を何度も観察することが可能である。したがって同じ試料を光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察することが可能であり、上述の光学顕微鏡と電子顕微鏡の併用によるイメージングにとって極めて有用である。さらに ATUM は 30nm 程度の人力では回収に熟練を要するような超薄切片でも安定して回収できる。ただし SBF-SEM や FIB-SEM ではブロックの向きが一定であることから得られる画像の方向が一定であり、大がかりなアラインメントを必要としないのに対し、ATUM で回収される試料は方向が必ずしも一定ではないため、画像取得後に大幅なアラインメントを必要とする。

光学顕微鏡と電子顕微鏡で同じ試料を観察するためには、試料作製法の改良や画像処理技術などのコンピュータ科学の発展が今後重要な鍵となるものと考えられる。例えば、GFP等の蛍光タンパク質は、電子顕微鏡での観察のための処理としてオスmium酸で染色したり、エポンなどの電子顕微鏡用疎水性樹脂に包埋したりすると蛍光が消失してしまう。したがってこれらの処理に耐性のある蛍光タンパク質や蛍光色素の開発が求められ

る。また電子顕微鏡で広い範囲の画像を取得したり3次元再構築したりするためには、セグメンテーション技術の自動化や膨大な画像データを処理するための計算機の能力の向上が必要であろう。特にATUMで取得した試料の3次元再構築化の場合、アラインメントの自動化も重要である。

利益相反：なし

1. Denk W et al: PLoS Biol **2**: e329, 2004
2. Lehrer J: Nature **457**: 524-527, 2009