

連続切片走査型電子顕微鏡（SEM）法と蛍光免疫組織化学を
組み合わせた 3D 再構築法の開発
— 下垂体内分泌組織への応用と可能性 —

久住 聡

新潟大学大学院医歯学総合研究科
顕微解剖学分野
(主任：牛木辰男教授)

Three-dimensional (3D) reconstruction of embedded biological tissue samples by the combined use of serial section scanning electron microscopy (SEM) and immunofluorescence microscopy.
— Its application to pituitary tissues —

Satoshi Kusumi

Division of Microscopic Anatomy
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Director: Prof. Tatsuo Ushiki)

要 旨

近年、超薄連続切片を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察し三次元（3D）再構築を行う方法が注目を集めている。これまで、この連続切片 SEM 法を用いた組織の 3D 構造解析がいくつか報告されてきたが、この 3D 再構築像と免疫組織化学所見との正確な相関解析は行われてこなかった。そこで本研究では、水溶性樹脂に包埋した組織標本の超薄連続切片の一部に蛍光免疫組織化学を施し、その後すべての切片を重金属染色することで連続切片 SEM 像を取得する新しい手法を開発した。これにより 3D 再構築像と免疫染色像の正確な比較観察を可能にした。その例として、多種類のホルモン産生細胞が混在する下垂体前葉を用い、免疫組織化学的に細胞を同定した上で、各細胞の分布や血管との空間的位置関係、個々の細胞の形状や細胞同士の親和性についての解析を行った。その結果、単一切片の観察だけでは理解しにくい細胞の立体形状や細胞間の空間的關係について詳細な解析が可能となった。さらに、本手法で作製した 3D 再構築像に形態計測解析ツールを用いることで、定量的な解析も可能となった。本研究で開発した手法は多様な組織に応用が可能であることから、3D 再構築像に物質の局在を正確に結びつける技法として、様々な分野に応用されることが期待できる。

キーワード：連続切片 SEM 法，3D 再構築法，下垂体前葉細胞

Reprint requests to: Satoshi Kusumi
Division of Microscopic Anatomy, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku, Niigata, 951-8510

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区
旭町通 1-757 新潟大学大学院医歯学総
合研究科 顕微解剖学分野 久住聡

序 論

近年、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた連続断層像撮影と、それによる三次元 (3D) 再構築法が生体組織構造解析に応用され、注目を集めている。SEM による連続断層像の取得には、大きく分けて 2 つの手法がある。1 つは、あらかじめ SEM の試料室内に入れた樹脂包埋標本の表面を何らかの方法で切削しながら、随時その反射電子像を取得していくものである。この連続ブロック面観察法には、収束イオンビーム (FIB) を用いた方法 (FIB/SEM) や¹⁾²⁾、鏡体内部に組み込んだマイクロトームによる切削法 (SBF/SEM) が知られている³⁾。もう一方は、通常のウルトラマイクロトームで樹脂包埋標本の超薄連続切片を作製し、それをガラスなどの硬い基板に載せた後に SEM の反射電子像で随時観察する方法である (連続切片 SEM 法もしくは Array tomography)⁴⁾⁸⁾。

このうち、連続ブロック面観察法は、切削厚を非常に薄く (数 nm~50nm) 設定することが可能で、しかも連続像のアライメント (軸合わせ) を気にせず自動撮影できることから、高詳細な 3D 再構築像を得ることができるという利点がある。その反面、現状では試料の染色法に大きな制限があること⁹⁾や、連続像の取得が試料を破壊しながら進むという問題点も知られている。それに対し、連続切片 SEM 法は、厚さ (Z 軸) 方向の解像度が連続ブロック面観察法に劣るものの (現実的には 80nm~200nm 程度)、①染色法の自由度が高く、切片作製後にウラン・鉛の電子染色を行うことができる、②広領域の標本観察が可能である、③観察した切片の視野を変えて何度でも再観察することが可能である、などの利点がある。

これまで我々は、連続切片 SEM 法の有用性について、下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞のゴルジ装置を 3D 再構築することで示してきた⁴⁾。一方で、下垂体前葉には 5 種類のホ

ルモン産生細胞と 1 種類のホルモン非産生細胞が混在するため¹⁰⁾¹¹⁾、通常の超薄切片像のみでは特定の細胞を正確に同定することが難しいことも実感した。この問題を克服するには、通常の切片像に免疫組織化学的裏付けが加わる必要がある。

そこで本研究では、水溶性樹脂に包埋した試料の超薄連続切片の一部に免疫染色を施し、得られた情報を元に SEM 断層像の 3D 再構築を行う新しい手法の開発を試みた。ここでは、この手法を紹介し、下垂体前葉組織の細胞同定に応用することで各細胞の立体形状や相互関係を解析した結果も示した。

材料と方法

1. 抗体

成長ホルモン (GH)、プロラクチン (PRL)、黄体化ホルモン (LH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の局在を解析するために、一次抗体として、ヤギ抗 GH 抗体 (1:100, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA)、マウス抗 LH 抗体 (1:100, Abcam plc, Cambridge, UK)、マウス抗 ACTH 抗体 (1:50, Enzo Life Sciences, Inc., New York, USA)、ウサギ抗 PRL 抗体 (1:2000) とウサギ抗 TSH 抗体 (1:500) (群馬大学、的崎尚教授より提供) を用いた。

また、対応する二次抗体として、それぞれ Alexa Fluor® 546 ロバ抗ヤギ IgG, Alexa Fluor® 488 ロバ抗マウス IgG, Alexa Fluor® 647 ロバ抗ウサギ IgG (1:200, Invitrogen, California, USA) を用いた。

2. 材料と前処置

材料として、Wistar 系雄ラット (約 20 週齢) を用いた。実験については、新潟大学動物実験倫理委員会の承認 (209-2 号) を得て、新潟大学動物実験指針に沿って行った。ラットを麻酔

下で左心室より生理食塩水を血管灌流後、4%パラホルムアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液) で灌流固定を行った後に、下垂体を摘出し、同固定液で更に浸漬固定 (4°C, 一晚) した。固定した下垂体は数個に細切後、エタノール上昇系列による脱水を行い、LR White 樹脂に包埋した。

3. 連続切片 SEM 試料作製

①準超薄切片の作製：包埋した標本の 1 μ m 厚切片を、ウルトラミクロトーム (EM UC7, Leica, Wetzlar, Germany) を用いてダイヤモンドナイフ (histo, Diatome Inc., Biel, Switzerland) で切削し、スライドガラス上に採取した。その後、トルイジン青で染色し、光学顕微鏡 (光頭) で検鏡して連続切片を作製するトリミング領域を決めた。

②トリミング：樹脂ブロックの目的部位を両刃のカミソリを用いて台形状にトリミングした。この際、台形の上辺と下辺が正確に平行になるように注意し、最終的な台形のサイズは上辺 0.7mm, 下辺 1mm, 高さ 0.6mm を目安とした。

③超薄連続切片のリボン作製と切片の回収：超薄連続切片用の切削にはダイヤモンドナイフ (ultra 45°, Diatome Inc., Biel, Switzerland) を用い、200nm 厚で連続切削した。連続切片のリボンは、7-10 枚ごとに睫毛を使ってナイフから外し、再び切削・剥離を繰り返すことで 4 列のリボン (切片約 30-40 枚) を作製した。これらのリボンを内径 7mm のトランスファーリング (Micro Star, Tokyo, Japan) に収まるよう整列し、ピックアップした後に、スライドガラス上に載せてホットプレート (50°C) で乾燥させ、貼り付けた。

④免疫染色用切片の抜き出し：上記の方法で 40 枚ほどの連続切片をスライドガラス上に載せた後、さらに免疫組織化学用の切片を 2 枚切削し、それぞれ異なるスライドガラスに貼り付

けた。その後、再び連続切片リボンの作製と貼り付けを行い、約 40 枚おきに 2 枚の切片を抜き出すというサイクルを繰り返した (図 1)。本研究では、最終的にこの方法で 200nm 厚の連続切片を約 300 枚取得した。

4. 蛍光免疫組織化学 (蛍光免疫染色)

用いた抗体の性質から、下垂体前葉に存在する 5 種類のホルモンを 1 つの切片で一度に免疫染色することが不可能なため、抜き出した免疫染色用の 2 枚の隣接切片の片方は GH, PRL, ACTH に対する抗体で、もう片方は GH, LH, TSH に対する抗体で、それぞれ免疫染色を行った (図 1)。

まず、2%正常ロバ血清 (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, USA) でブロッキング処理 (30 分) を行い、次に一次抗体の混合液 (ヤギ抗 GH 抗体, マウス抗 ACTH 抗体, ウサギ抗 PRL 抗体の組み合わせ、またはヤギ抗 GH 抗体, マウス抗 LH 抗体, ウサギ抗 TSH 抗体の組み合わせ) を反応させ (4°C, 一晚), PBS で洗浄 (3 分 3 回) した後に二次抗体の混合液 (Alexa Fluor® 546 ロバ抗ヤギ IgG, Alexa Fluor® 488 ロバ抗マウス IgG, Alexa Fluor® 647 ロバ抗ウサギ IgG) を反応させた (室温, 60 分)。PBS で洗浄後 (3 分 3 回), 封入剤 (SlowFade® Antifade Kit, Invitrogen, California, USA) で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) でそれぞれのホルモンの局在を観察、撮影した。

5. 四酸化オスミウムによる後固定とウラン・鉛染色

得られた連続切片リボンと免疫染色観察後の切片の両方に、1%四酸化オスミウムを数滴 (約 50 μ l) 垂らし 60 分間後固定を行った。次に、1%酢酸ウランで 10 分間染色した後、Reynolds の鉛液で 5 分間染色した。

6. 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、ダイヤモンドペンを用いて約 1cm×1cm の大きさに整形した後、カーボンテープを用いて SEM 試料台に貼り付け、導電処理のため白金パラジウムによるスパッタコーティング（約 1nm 厚）を行った。

7. SEM 観察と連続像の取得

観察には汎用型 SEM（SU-3500, Hitachi, Tokyo, Japan）を用い、加速電圧 7kV で反射電子像の撮影を行った。この際、共焦点レーザー顕微鏡観察で得られた蛍光免疫染色像と同一の領域を連続撮影（2560px×1920px, BMP 形式）し、光頭像と電頭像の相補観察を可能にした。

8. 3D 再構築法

①アライメントの調節：SEM による連続撮影像を、3D ソフトウェア（Amira 5.5, VSG-FEI, Bordeaux, France）に読み込み、アライメントの調節を行った。この際、最初に自動整列を行い、目視で確認後、必要に応じて微調整を行った後に、新たに TIFF 形式で保存した。

②セグメンテーション（領域選択）：アライメント調節をすませた連続像を、画像処理ソフトウェア（Photoshop CS5, Adobe Systems Inc., California, USA）に読み込み、3D 再構築を行う構造（5 種類のホルモン産生細胞と血管）ごとに 1 枚ずつ手で領域選択を行った。この際、選択範囲は Alpha channel に記録し、構築に用いる画像領域を切り取った後にリサイズして保存した（800px×800px, TIFF 形式）。

③連続切片の 3D モデル表示：セグメンテーションをすませた連続像を 3D ソフトウェアに再度読み込み、記録した Alpha channel のデータに従ってサーフェスレンダリング法による 3D モデルを作製した。さらに、得られた再構築像にソフトウェア上で回転、拡大縮小、表示/非表示などの操作を加えることで、詳細な形

態解析を行った。

結 果

1. 蛍光免疫染色像と SEM 像の相補観察

超薄連続切片作製時に抜き出した免疫染色用の 2 枚の隣接切片にそれぞれ GH, ACTH, PRL と GH, LH, TSH の免疫三重染色を施し、それぞれ共焦点レーザー顕微鏡で観察することで、切片ごとに 3 種類ずつのホルモン産生細胞の局在を明らかにすることができた。その際、2 枚のいずれの切片にも GH の免疫染色を施したことで、GH 細胞の分布を元に 2 枚の隣接切片の位置情報を結びつけることが可能になった。その結果、2 枚の切片を重ね合わせて、疑似的に 5 種類の免疫染色を施した蛍光免疫染色像を作製することに成功した（図 2a）。また、この蛍光免疫切片像と、その後に撮影した同一切片の SEM 像（図 2b）を対比観察することで、SEM 像で観察される各細胞の種類を同定することができた。両者を詳しく比較すると、それぞれの細胞の形はかなり複雑であるのに対し、免疫染色に用いたのはホルモンの抗体であることから、細胞内の果粒だけが染まっており、必ずしも細胞の輪郭を反映していなかった（図 2c）。しかし、灌流固定により細胞間が多少開いて固定されたこともあり、注意深く観察することで、得られたすべての連続切片において、ホルモン産生細胞の形状をかなり正確に解析することができるようになった（図 2d）。

2. ホルモン産生細胞と血管の立体再構築像と形態計測の解析

上記の蛍光免疫染色像との相補観察によって得られた細胞の分類に従って、SEM 連続切片像から各ホルモン産生細胞の 3D 再構築像を作製した。同時に、血管内皮細胞と内腔についても構築を行った（図 3）。これにより、各ホルモン産生細胞と血管の分布や空間的位置関

係を立体的に観察することが可能となった。3D再構築像を詳しく観察すると、ACTH細胞を除く4種のホルモン産生細胞はいずれも血管にどこかを接していたが、ACTH細胞は血管との関係が希薄な傾向があった。

さらに、各ホルモン産生細胞の3D再構築モデルからそれぞれのホルモン産生細胞を1つずつ切り出し、ステレオ像を示した(図4)。その結果、GH細胞(図4a)は小型で少し伸びたいびつな楕円体をしてしていたが、PRL細胞(図4b)は小型の平たい形状をしており、一部に細長く突起を伸ばしているものが見られた(矢印)。また、LH細胞(図4c)は大型の細胞であり、球形を呈していた。TSH細胞(図4d)は大型で細長い形状をしており、全体的にいびつな形をした細胞であった。ACTH細胞(図4e)は小型で角ばった形をしてしていた。また、これらの細胞について、ソフトウェア上の計測ツールを用いた体積と表面積の計測を行うこともできた(図4f)。

3. ホルモン産生細胞同士の親和性について

次に、作製した3D再構築像から特定の細胞のみを抜き出して観察することにより、異なるホルモン産生細胞同士の関係を解析した。その結果、特定の細胞同士が密接に接している様子が観察され(図5)、LH細胞の周囲を複数のPRL細胞が広く覆っている様子が明瞭に示された(図5a)。また、GH細胞とACTH細胞に注目すると、GH細胞の集団の隙間にACTH細胞がはまり込む様子も示された。さらに、ソフトウェア上で隣接する細胞同士の接着面積を計測することで、異なる細胞間の親和性を定量的に示すことが可能となった。

考 察

本研究では、連続切片SEM法の利点を最大限活用し、連続切片の中の一部に免疫染色を行

った後に3D再構築を行う新しい手法を開発した。LR Whiteを始めとした水溶性樹脂は、これまで超薄切片を脱樹脂することなしに免疫染色するために用いられてきた。本研究ではこの特徴を利用し、LR White包埋の連続切片の一部に蛍光免疫染色を施した後に、その切片を含めたすべての連続切片にオスmiumとウラン・鉛の重金属染色を施し、SEMの反射電子像で観察することで、透過型電子顕微鏡(TEM)のコントラストに近い切片像をSEMで得ることに成功した。ここでは、観察する細胞の大きさを考慮して、免疫染色用の2枚の隣接切片を6-8 μ m厚ごとに数組抜き取り、それぞれ計5種類の免疫染色を施した。しかし、本法では原理的にはすべての切片を用いてさらに多種類の免疫染色を行うことも可能である。また、将来的には機能分子の局在と立体再構築像の相補観察の可能性が期待できるなど、大きな可能性を秘めた手法となることが期待される。

1. 蛍光イメージングにより同定された細胞の空間的分布と血管との位置関係

本研究では、低倍率で撮影した連続切片を立体再構築することで、その領域に含まれる各ホルモン産生細胞の分布や血管との位置関係を立体的に表すことができた。細胞同士や細胞と血管との親和性については、これまでの単一切片では観察が不十分であったが、連続切片SEM像の3D再構築法はきわめて有用であった。今後は各前葉細胞について多数の観察を行うことで、各細胞の血管との親和性やその3D形態についての解析が期待できる。さらに、本手法は下垂体に限らず他の多様な組織への応用も可能であり、免疫組織化学的に同定した細胞と周辺構造との関連を解析する上で大いに期待される魅力的な手法である。

2. 各ホルモン産生細胞の全体形状と形態計測

下垂体前葉細胞の分類は、これまで主に光顕と TEM を用いた観察によって行われてきた¹⁰⁾¹¹⁾。これらの研究により、切片における各前葉細胞の特徴は詳細に解析されてきたが、これまで三次元的な細胞の形状解析にはほとんど注意が払われなかった。本研究では、3D ソフトウェア上で個々の細胞を切り抜いて表示することで、それぞれの全体形状について三次元的に明瞭に解析することが可能にした。

さらに本手法では、これらの 3D 再構築像から、一個の細胞の体積と表面積を計測することも可能となった。本研究では一例のみを表示したが、今後は多数の細胞の形態を計測することで、統計学的な解析も期待できそうである。

3. ホルモン産生細胞間の親和性

細胞同士の関係について、いくつかのホルモン産生細胞同士が親和性を持つことは以前の研究からもよく知られている¹²⁾⁻¹⁵⁾。本研究では、PRL 細胞から伸びた薄い膜状の細胞質が、LH 細胞の周囲を取り巻いている様子が 3D 再構築法により示された。この所見は、TEM 観察においてこれまでカップ型 PRL 細胞と呼ばれてきたものと特徴がよく一致している¹²⁾¹³⁾。切片の TEM 観察では、細胞体から出た細い突起が LH 細胞周囲に張り付いているように見えるが、本研究の 3D 解析では、LH 細胞表面を PRL 細胞が膜状に包んでいることが明瞭である。また、ACTH 細胞が GH 細胞の隙間に挟まったような形をしていることが示されたが、これは、TEM 観察で ACTH 細胞が複数の GH 細胞に取り囲まれ星形を呈していることとよく一致している¹²⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。

結 論

本研究では、連続切片 SEM 法と蛍光免疫組織化学の組み合わせにより、免疫組織化学的に正確に同定した細胞の 3D 再構築を可能とする

新しい方法を開発した。その一例としてラット下垂体前葉を用い、各ホルモン産生細胞の分布や細胞と血管との位置関係、個々の細胞の形状や細胞間の親和性について三次元的に示した。ここで開発した連続切片 SEM 法では、免疫染色による多重染色を容易に行うことが可能であり、今後様々な組織への応用が大いに期待できる手法である。

謝 辞

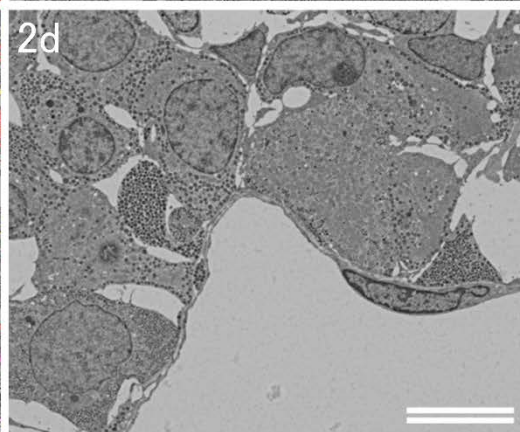
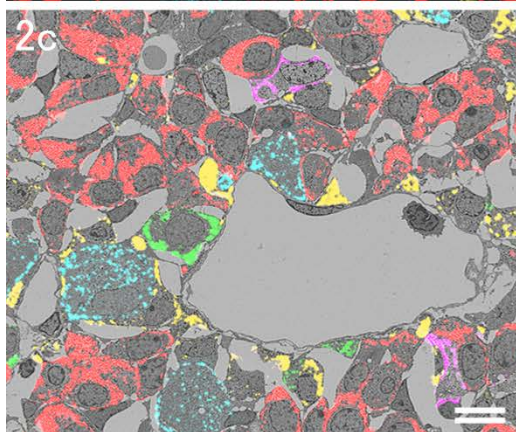
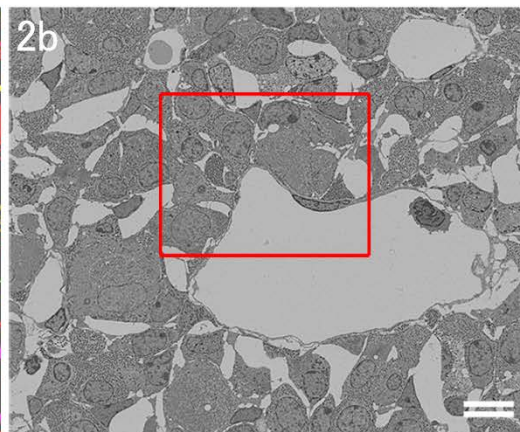
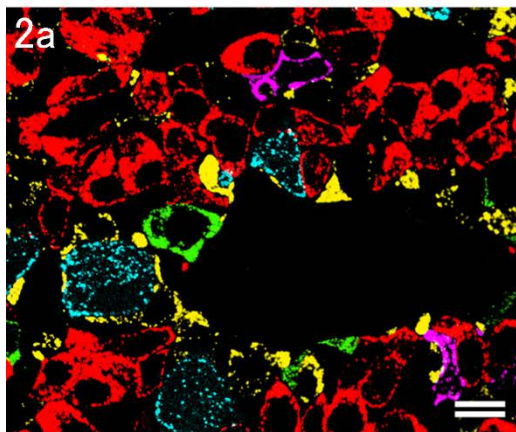
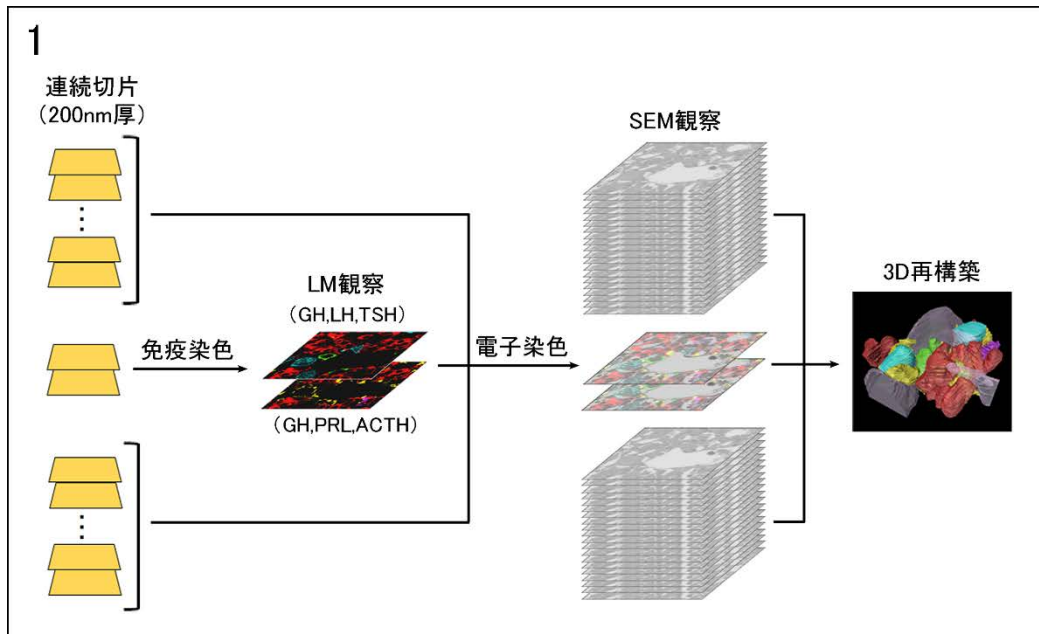
この稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科顕微解剖学分野 牛木辰男教授と、甲賀大輔講師に深謝するとともに、抗体をご提供いただきました群馬大学生体調節研究所 的崎尚教授に感謝申し上げます。

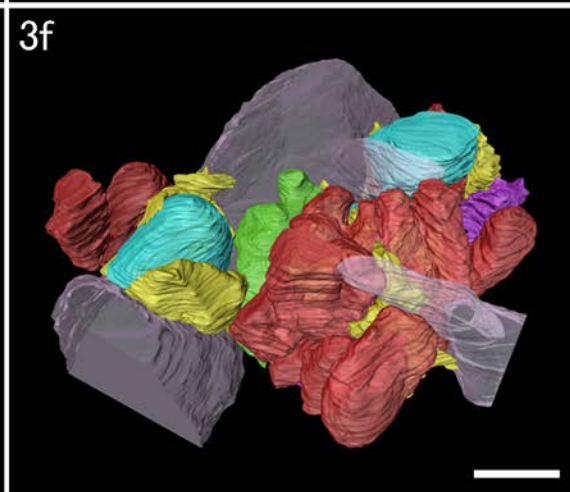
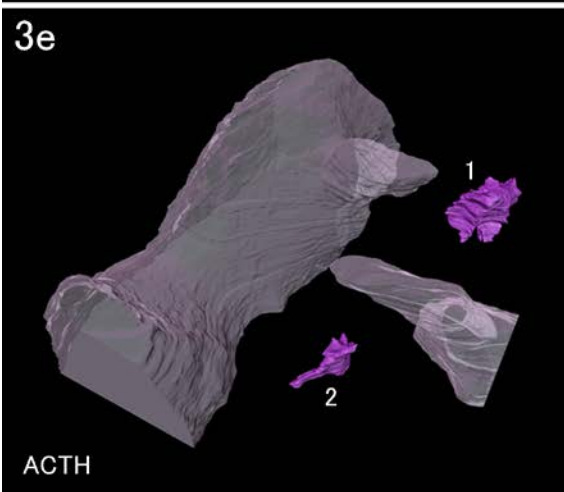
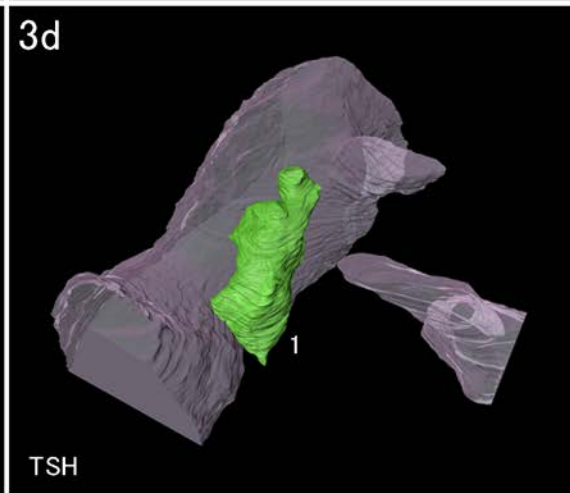
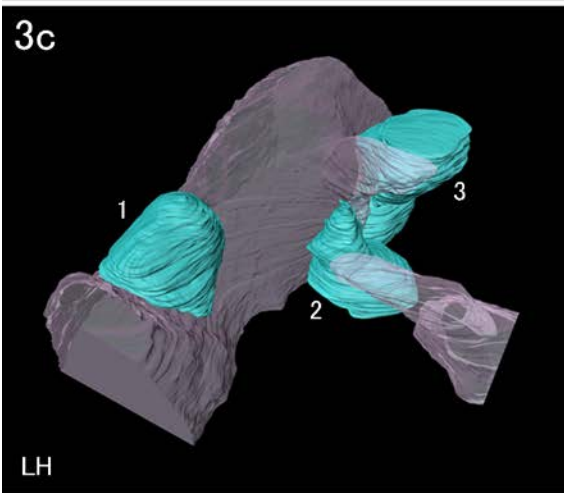
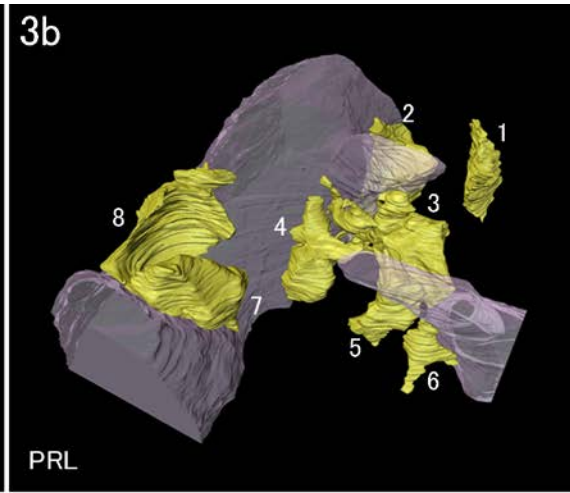
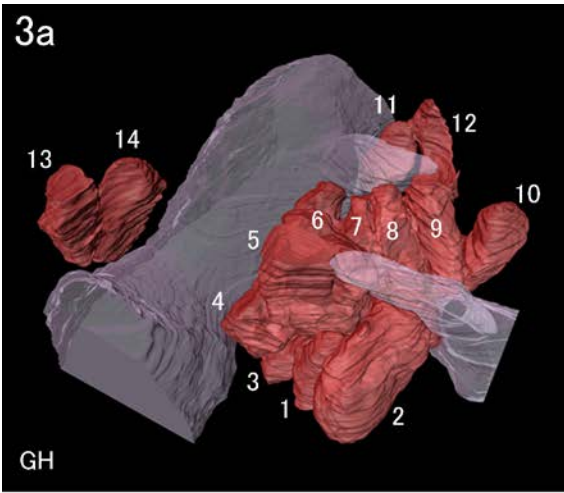
文 献

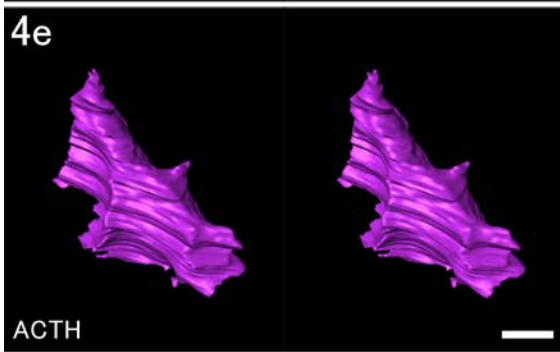
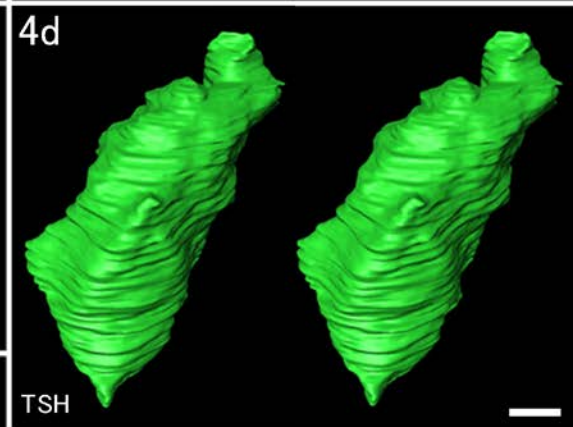
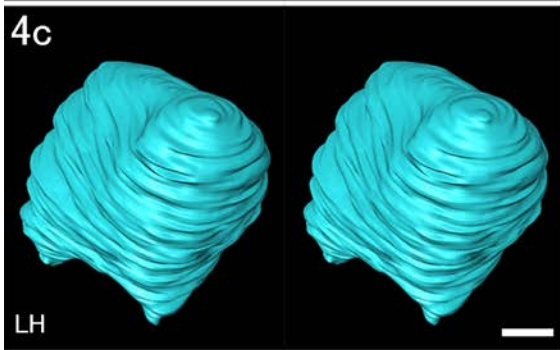
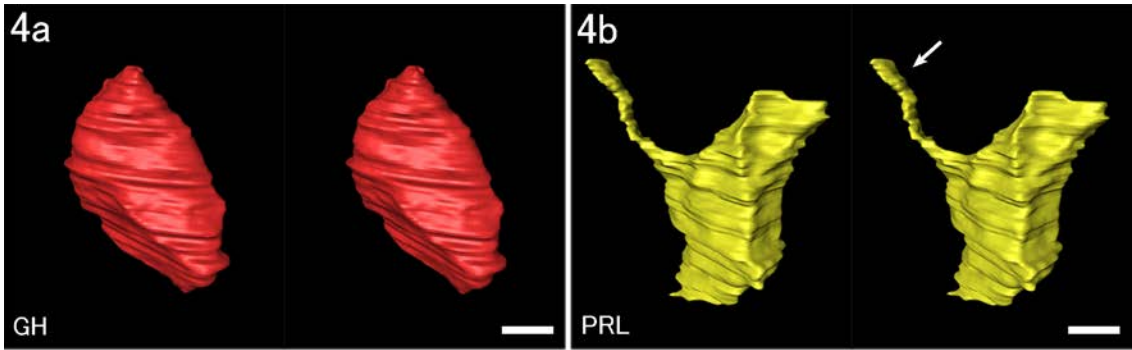
- 1) Wanner G, Schäfer T and Lütz-Meindl U: 3-D analysis of dictyosomes and multivesicular bodies in the green alga *Micrasterias denticulata* by FIB/SEM tomography. *J. Struct. Biol.* 184:203-211, 2013.
- 2) Ohta K, Sadayama S, Togo A, Higashi R, Tanoue R and Nkamura K: Beam deceleration for block-face scanning electron microscopy of embedded biological tissue. *Micron* 43:612-620, 2012.
- 3) Denk W and Horstmann H: Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol.* 2:1900-1909, 2004.
- 4) 甲賀大輔, 久住聡, 牛木辰男: 連続切片 SEM 法とゴルジ装置の 3D 構造解析への応用. 顕微鏡 in press
- 5) Wacker I and Schroeder RR: Array tomography. *J. Microsc.* 252:93-99, 2013.

- 6) Horstmann H, Körber C, Sätzler K, Aydin D and Kuner T: Serial section scanning electron microscopy (SSEM) on silicon wafers for ultra-structural volume imaging of cells and tissues. *PLoS One* 7:e35172, 2012.
- 7) Reichelt M, Joubert L, Perrino J, Koh AL, Phanwar I and Arvin AM: 3D reconstruction of VZV infected cell nuclei and PML nuclear cages by serial section array scanning electron microscopy and electron tomography. *PLoS Pathog.* 8:e1002740, 2012.
- 8) Micheva KD and Smith SJ: Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits. *Neuron* 55:25-36, 2007.
- 9) Deerinck T, Bushong E, Lev-Ram V, Shu X, Tsien R and Ellisman M: Enhancing serial block-face scanning electron microscopy to enable high resolution 3-D nanohistology of cells and tissues. *Microsc. Microanal* 16:1138–1139, 2010.
- 10) 黒住一昌: 下垂体前葉細胞の分類. *山口獣医学雑誌* 15:1-42, 1988.
- 11) Kurosumi K: Functional classification of cell types of the anterior pituitary gland accomplished by electron microscopy. *Arch Histol Jpn.* 29:329-62, 1968.
- 12) Nakane PK: Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J Histochem Cytochem.* 18:9-20, 1970.
- 13) Nogami H and Yoshimura F: Fine structural criteria of prolactin cells identified immunohistochemically in the male rat. *Anat Rec.* 202:261-74, 1982.
- 14) Yoshimura F and Nogami H: Fine structural criteria for identifying rat corticotrophs. *Cell Tissue Res.* 219:221-8, 1981.
- 15) Siperstein ER and Miller KJ: Further

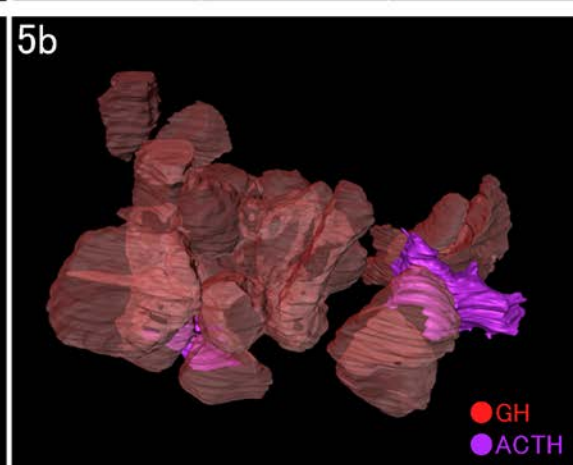
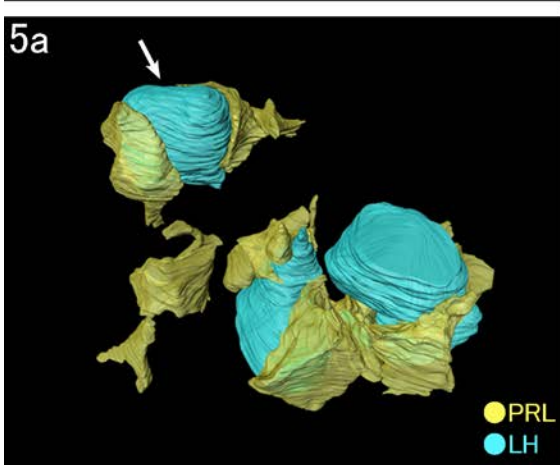
cytophysiologic evidence for the identity of the cells that produce adrenocorticotrophic hormone. *Endocrinology* 86:451-86, 1970.







4f	表面積 μm^2	体積 μm^3
GH	512.03	749.14
PRL	482.25	405.67
LH	1226.80	2747.59
TSH	1390.26	2140.88
ACTH	559.70	529.61



図の説明

図 1. 蛍光免疫染色を組み合わせた連続切片 SEM 法とその 3D 再構築の概念図

まず LR White 樹脂に包埋した標本から 200 μm 厚の超薄連続切片を作製する。この連続切片の一部に免疫染色を施した後に、すべての切片を電子染色して SEM (反射電子) 観察を行う。その後、あらかじめ作製した免疫染色像と連続切片像を比較し、目的の構造 (細胞) の領域を選択した後、連続 SEM 像から 3D 再構築像を作製する。

図 2. 蛍光免疫染色像と SEM 像の比較観察

a. 2 枚の隣接切片をそれぞれ 3 重染色した後に共焦点レーザー顕微鏡で観察し、それらの像を一枚に重ね合わせて作製した免疫染色像。赤色: GH 細胞、黄色: PRL 細胞、水色: LH 細胞、緑色: TSH 細胞、紫色: ACTH 細胞。b. 蛍光免疫染色像と同一視野の SEM 像。c. 蛍光免疫染色像と SEM 像の重ね合わせ像。d. SEM 像 (2b の赤枠内) の拡大。スケールバー: 10 μm

図 3. 各ホルモン産生細胞と血管の 3D 再構築像

a-e. 血管と各ホルモン産生細胞との関係を示したもの。赤色: GH 細胞、黄色: PRL 細胞、水色: LH 細胞、緑色: TSH 細胞、紫色: ACTH 細胞、ピンク色: 血管。それぞれの図に見えている細胞に番号をふってある。f. 血管と 5 種類のホルモン産生細胞との関係をまとめて示したもの。スケールバー: 20 μm

図 4. 各ホルモン産生細胞のステレオペア像 (平行法、4a-e) とそれぞれの細胞の定量的解析の一例 (4f)

図 3 においてそれぞれ番号 1 で示した細胞を抜き出したもの。a. GH 細胞 (赤色)。b. PRL 細胞 (黄色)。c. LH 細胞 (水色)。d. TSH 細胞 (緑色)。e. ACTH 細胞 (紫色)。スケールバー: 5 μm
f. 各細胞の表面積と体積。

図 5. ホルモン産生細胞同士の親和性を示す 3D 再構築像

a. PRL 細胞 (黄色) と LH 細胞 (水色) の関係を示す。矢印に示す LH 細胞とそれを覆う PRL 細胞の接着面積は 572.5 μm^2 であり、LH 細胞の表面積の 46.7% に当たる。b. GH 細胞 (赤色) と ACTH 細胞 (紫色) の関係を示す。