

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	久住 聡
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第615号
学位授与の日付	平成27年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	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—
論文審査委員	主査 教授 佐藤 昇 副査 教授 味岡 洋一 副査 教授 牛木 辰男

### 博士論文の要旨

#### 背景と目的

近年、超薄連続切片や連続切削ブロック面を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察し、目的の構造の三次元 (3D) 再構築を行う方法が注目を集めている。とくに連続切片 SEM 法は従来の電子染色が可能なることもあり、さまざまな組織の 3D 構造解析に有用であるが、そこで得られる 3D 再構築像と免疫組織化学所見との正確な相関解析はこれまで行われてこなかった。そこで申請者らは、水溶性樹脂に包埋した組織標本の超薄連続切片を作製し、そ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してから連続切片 SEM 像を取得するという新しい手法の開発を試みた。これにより 3D 再構築像と免疫染色像の正確な比較観察が可能となることが期待される。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。

#### 材料と方法

材料として Wistar 系雄ラットを用い、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した下垂体前葉の組織を LR White 樹脂に包埋した。この樹脂ブロックの目的の部位を、上辺と下辺が平行な台形にトリミングし、ウルトラマイクロトームでダイヤモンドナイフを用いて 200nm 厚の超薄連続切片を作製し、スライドガラスに貼り付けた。この際、約 40 枚の連続切片を 1 枚のスライドガラスに貼り付けたのちに、免疫組織化学用の切片を 2 枚抜き出し別のスライドガラスに貼り付け、また約 40 枚の連続切片をまとめて 1 枚のスライドガラスに採取するというサイクルを繰り返し、最終的に約 300 枚の連続切片を取得した。この過程で抜き出した免疫染色用の 2 枚の隣接切片の片方には GH、PRL、ACTH に対する抗体で、もう片方には GH、LH、TSH に対する抗体で、それぞれ蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡でそれぞれのホルモンの局在を観察、撮影した。その後、残りの連続切片と免疫染色観察後の切片の両方に 1%四酸化オスミウムとウラン・鉛による重金属染色を施し、SEM 試料台に載台、金属コーティングした後に、汎用型 SEM で切片すべての反射電子像観察を行った。この際、共焦点レーザー顕微鏡で得られた蛍光免疫染色像と同一の領域を連続撮影し、光学顕微鏡 (光頭) 像と電子顕微鏡 (電頭) 像の相補観察を可能にした。得られた連続切片像は、

アライメント調節を行った後に、蛍光免疫染色の結果に従って画像処理ソフトウェアで領域選択を行い、3D ソフトウェアでサーフェスレンダリング法による 3D モデルを作製した。その後、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

超薄連続切片から抜き出した 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すことで、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。この際、両方の切片に GH の免疫染色を施したことで、その分布を元に 2 枚の隣接切片の位置情報を結びつけることが可能となり、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。その後、撮影した同一切片の SEM 像を対比観察することで、免疫組織化学的に正確なホルモン産生細胞の形状を、電顕レベルでかなり正確に解析することができるようになった。そこで、これに基づいて各ホルモン産生細胞の 3D 再構築像を作製し、同時に血管内皮細胞と内腔についての構築を行った。その結果、各ホルモン産生細胞と血管の分布や空間的位置関係が立体的に観察できるようになり、5 種類の内分泌細胞の中では ACTH 細胞が血管との関係がもっとも希薄であることが示された。また、切片像の中から、それぞれのホルモン産生細胞を 1 つずつ抜き出し、個々の形状を解析することを行った。さらに、特定の細胞種のみを抜き出して観察することで、LH 細胞と PRL 細胞、GH 細胞と ACTH 細胞が密接に接している様子が三次元的に明らかになった。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、各細胞の体積や表面積、細胞同士の接触面積についての定量的な解析も可能となった。

#### 考察

本研究では、連続切片 SEM 法の利点を最大限に活用し、蛍光免疫染色像と 3D 再構築像を正確に比較観察することができる新しい手法を開発した。すなわち水溶性樹脂に包埋した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四酸化オスミウム処理とウラン・鉛の重金属染色を施し、SEM の反射電子像で観察する方法である。これにより、免疫組織化学の情報を盛り込みながら、透過型電子顕微鏡 (TEM) のコントラストに近い切片像を SEM で取得することに成功した。また、ここで得られた連続像から蛍光免疫染色像をもとに細胞を同定し、その 3D モデルを作製することで、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、詳細な解析を可能にした。この方法により得られた 3D モデルは、形態計測解析ツールを用いることで、免疫組織化学で同定した構造の統計学的解析も可能であり、従来の単純な連続切片 SEM 法の可能性を高めるものである。さらに、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、今後は様々な分野に応用されることが期待できる。

#### 審査結果の要旨

超薄連続切片や連続切削ブロック面を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察し、目的の構造の三次元 (3D) 再構築を行う方法が用いられるが 3D 再構築像と免疫組織化学所見との正確な相関解析はこれまで行われてこなかった。そこで申請者は、水溶性樹脂に包埋した組織標本の超薄連続切片を作製し、その一部に蛍光免疫組織化学を施し、その後連続切片 SEM 像を取得するという新しい手法の開発を試みた。材料として Wistar 系雄ラット下垂体前葉を用い、下垂体前葉ホルモンに対する蛍光免疫染色を行い、同染色像と同一の領域を連続撮影し、光学顕微鏡 (光顕) 像と電子顕微鏡 (電顕) 像の相補観察の後、3D モデルを作製した。その結果、5 種類のホルモン産生細胞の電顕レベルでの形状や、また各ホルモン産生細胞と血管の分布や空間的位置関係が立体的に観察できるようになり、5 種類の内分泌細胞の中では ACTH 細胞が血管との

関係がもっとも希薄であることが示された。また、LH細胞とPRL細胞、GH細胞とACTH細胞が密接に接している三次元的構図が明らかになった。さらに作製した3D再構築像に形態計測解析ツールを用いることで、各細胞の体積や表面積、細胞同士の接触面積についての定量的な解析も可能であった。

以上、申請者は連続切片SEM法の利点を最大限に活用し、蛍光免疫染色像と3D再構築像を正確に比較観察することができる新しい手法を開発した。この手法は、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3D構造解析を可能にすると共に、定量的解析も可能とし、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、今後は様々な分野に応用されることが期待できるものである。以上の点に学位論文としての価値を認める。