

3次元内部構造顕微鏡(3D-ISM)を用いた生体試料の観察に関する検討

中村佐紀子(理化学研究所)

横田秀夫(理化学研究所)

牧野内昭武(理化学研究所) 姫

野龍太郎(理化学研究所)

背景

従来の微細な3次元構造の観察法

走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

SEMなどでは表面形状のみの観察で3次元構造が必要なシミュレーションモデルへの応用はできない



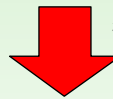
共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM)

ポストゲノム時代のイメージング

||

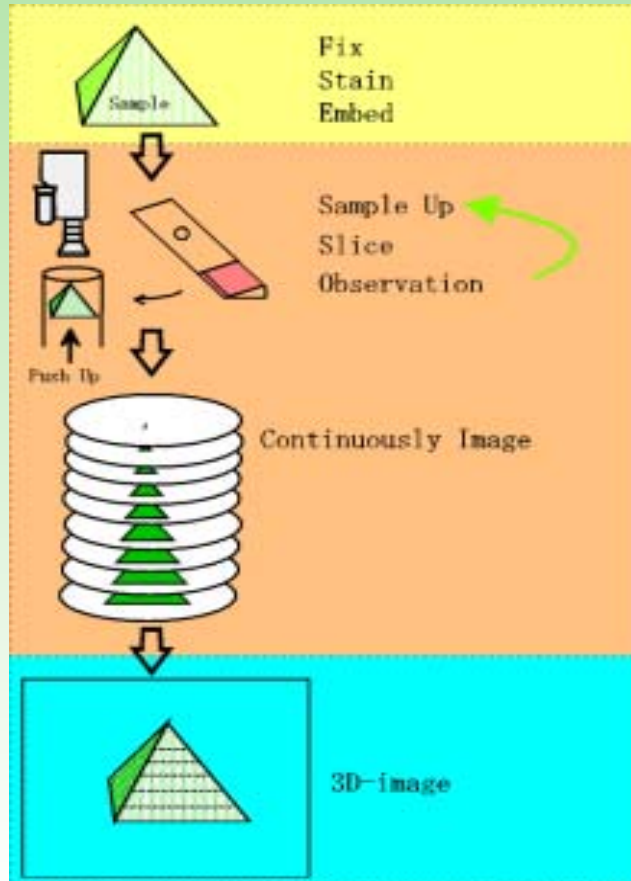
生体に近い組織や臓器レベルでの解析
CLSMは立体構造の観察は可能だが
観察範囲は試料上端より100 μ m程度

生体内発現遺伝子の3次元局在の新しい観察手法が必要



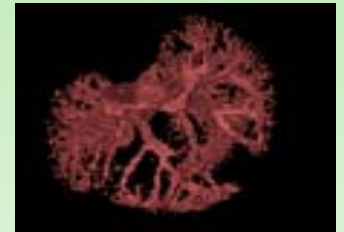
3次元内部構造顕微鏡 (3D-ISM)
を用いた微細構造の観察法を検討

3次元内部構造顕微鏡とは



立体構造を高精度かつ迅速に観察できるシステム

- **装置原理**



装置概要

3次元内部構造顕微鏡

(Three-Dimensional Internal Structure
Microscope: 3D-ISM)

対象物を切断し、残った断面画像の観察を繰り返して連続画像を得る装置
座標軸が得られる

利点: 深さ方向の観察範囲制限なし
欠点: 深さ方向の分解能なし

共焦点レーザースキャン顕微鏡

(Confocal Laser Scan Microscope: CLSM)

光学切片として試料が得られる
実際に試料を切断せずに立体構造観察可能
1 μm 以下の観察も可能

利点: 平面方向・深さ方向に高分解能
欠点: 観察範囲が試料上方より100 μm

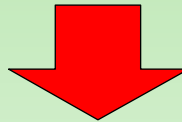
3D-ISM + CLSM

深さ方向に制限がなく高分解能な画像取得可能

(1 μm 分解能が可能)

目的

- CLSM + 3DISM装置を用いて生体内の微細3次元構造情報の取得



具体的観察対象

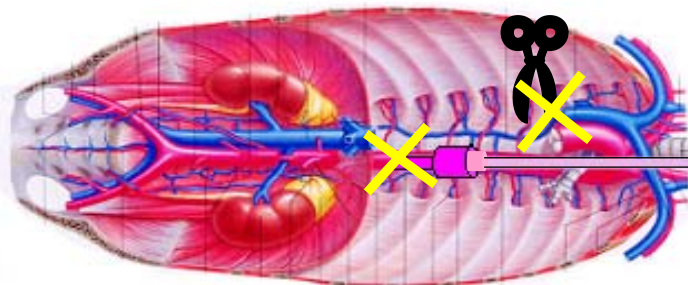
- ・生体試料内部の微細血管の3次元構造
マウス腎臓の微細構造血管の観察
- ・生体試料内部の発現遺伝子の3次元局在の観察
GFPマウスの心臓観察

マウス腎臓系球体観察

- 微細な血管構造の観察法の検討
- 圧力変化による毛細血管形状の変化

実験方法: 試料作成方法

試料: ICRマウス 9週齢



作成手順

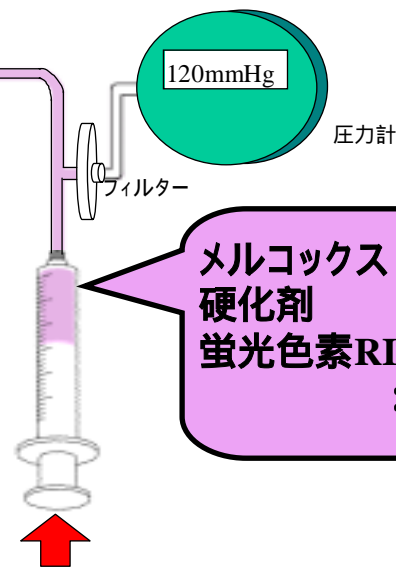
麻酔下にて開胸

下行大動脈を確保し、留置針刺入

ヘパリン添加生食にて灌流(右心房を切開)

蛍光色素添加メルコックス注入

注入後動脈注入部・心臓切開部を鉗子で挟む



メルコックス: 10ml
硬化剤 : 0.125g
蛍光色素RITC : 12.5ml

常圧モデル: 120mmHg
低圧モデル: 60mmHg

実験方法：樹脂の調製

- ・血管鑄型注入剤Mercox (メタクリレート系樹脂)

微細な血管内に注入可能で、SEM観察に使用
有色樹脂ではあるが、蛍光観察できない

→ Mercoxに蛍光色素を添加して使用

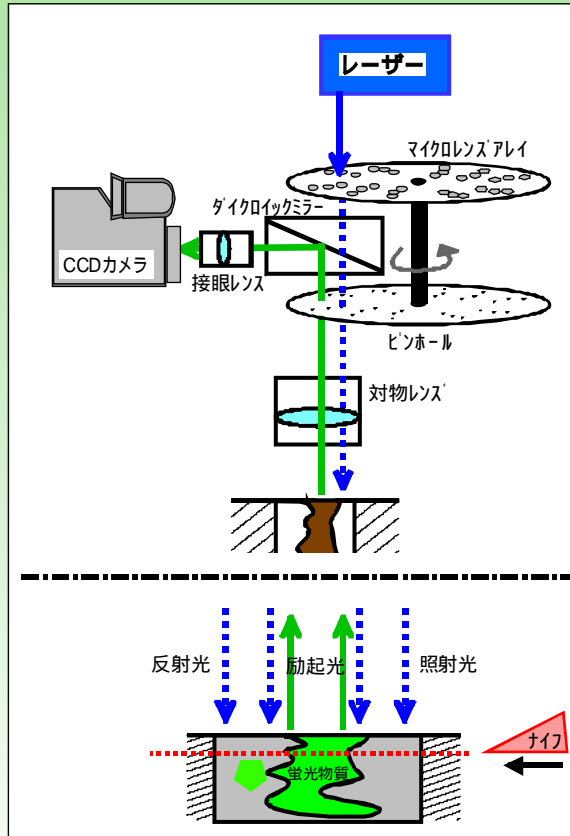
蛍光色素を用い観察対象のみ光らせることにより検出
能を高めることが可能

- ・低圧での注入は注入時間がかかり圧力制御が困難

→ Mercoxにメタクリレート・モノマーを添加

粘度を下げ、硬化時間の延長を図る

CLSM観察条件



共焦点レーザー光学系模式図

- 包埋方法:凍結包埋(OCTコンパウンド SAKURA)
- レーザ波長:568nm(Arガスレーザー)
- 出力:200mW
- DM:460nm 520nm 600nm(3波長透過)
- EM:中心波長:615nm
半値幅:30nm(OMEGA)

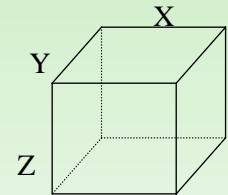
- ナイフ:ディスポーザブルナイフ
C35 (FEATHER)

- スライス厚さ:2.0 μ m
- ナイフ回転速度:60rpm
- 撮像カメラ:ICCD

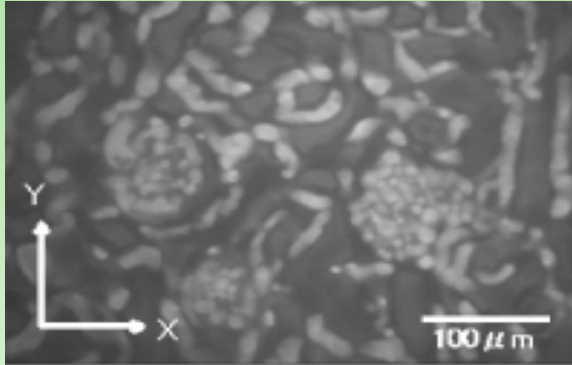
(浜松ホトニクス ICP300-DF)

- 対物レンズ:超長作動距離対物レンズ
M PLAN ApoSL x20 (MITUTOYO)

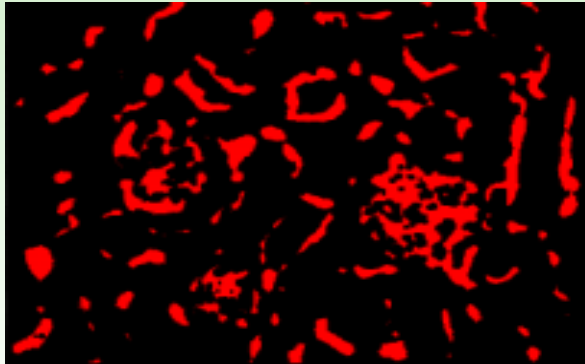
- 分解能: XY:0.7 μ m Z:2.0 μ m



観察結果および血管抽出

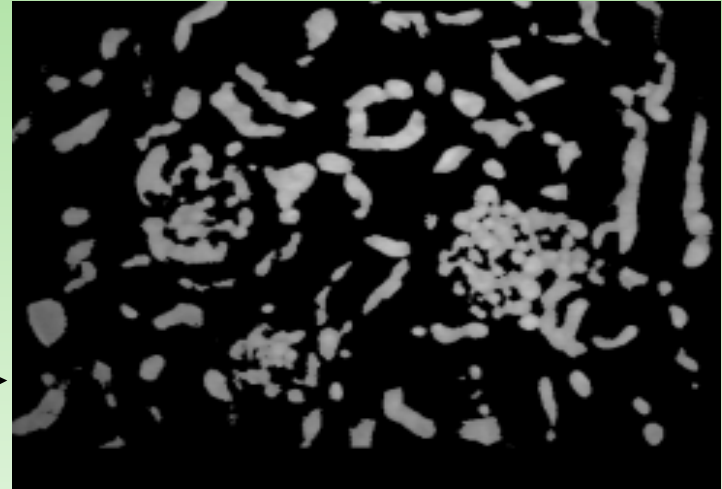


CLSM観察元画像



2値化 領域抽出画像

撮影枚数:500枚
撮影時間:5分



2値化領域の抽出及び濃淡情報の再付加
血管抽出画像

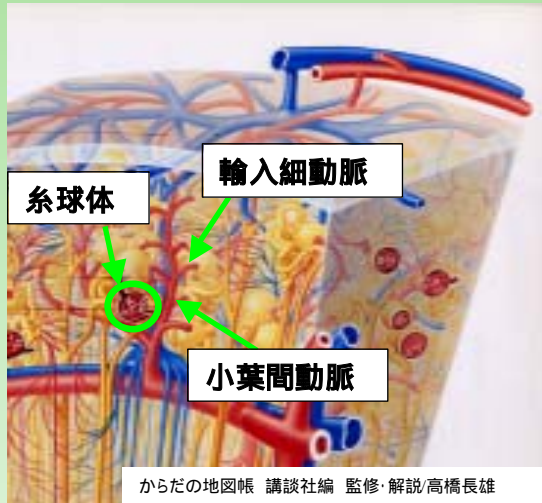
拡張Region Growing

停止条件を可変

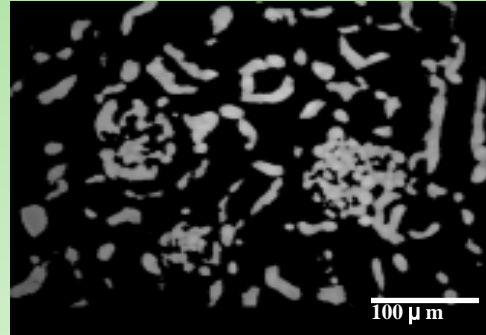
停止条件の局所判定

3次元処理

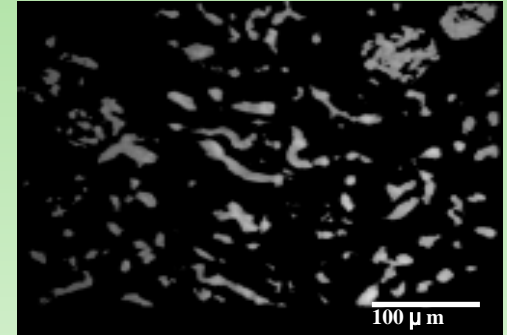
血管径計測結果



腎臓血管模式図



常圧注入血管抽出画像
(120mmHg)



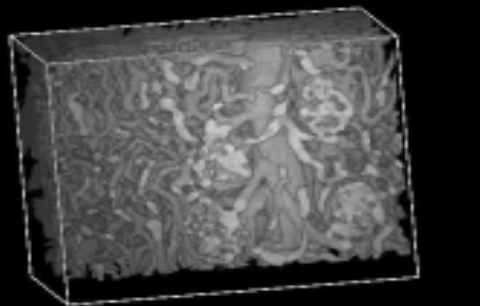
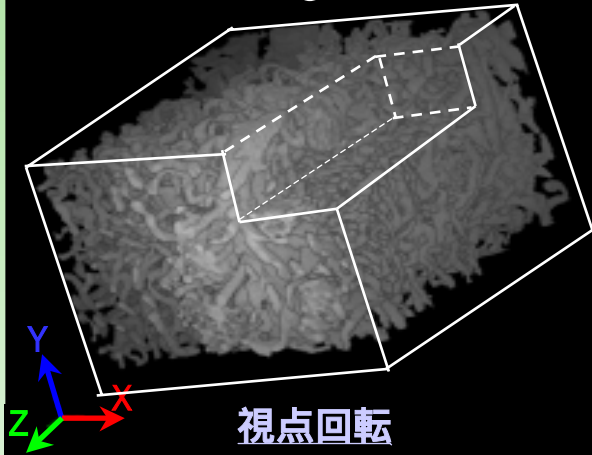
低圧注入血管抽出画像
(60mmHg)

観察部位	120mmHg平均血管径	60mmHg平均血管径	低圧/常圧
小葉間動脈	48.3 μm (N = 7)	35.8 μm (N = 3)	70%
輸入細動脈	17.7 μm (N = 11)	14.7 μm (N = 7)	80%
系球体周辺毛細血管	9.7 μm (N = 9)	9.1 μm (N = 7)	90%

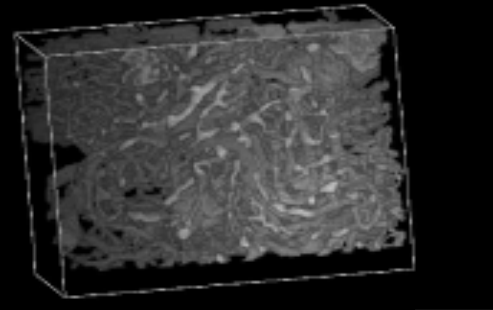
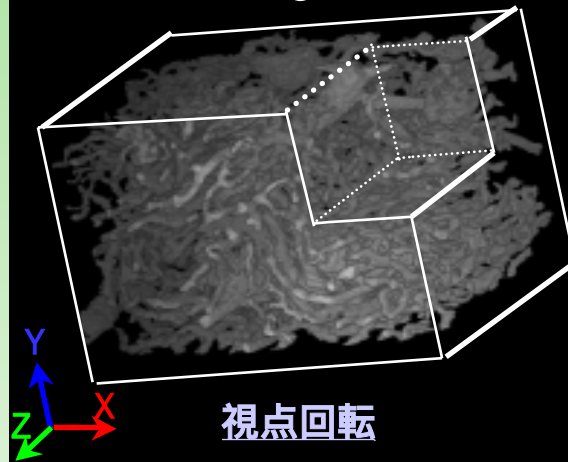
注入圧の変化による血管径の変化

血管構造の可視化

120mmHgモデル



60mmHgモデル



Resolution
X:0.7 μm
Y:0.7 μm
Z:2.0 μm

Area
X:448 μm
Y:336 μm
Z:300 μm

まとめ

- CLSM + 3DISMを組み合わせた装置ではSEM観察と同様の観察結果が得られた
- SEMと比較し、本手法は任意断面・角度で試料内部の立体構造の観察が可能
- CLSMと比較し、観察範囲の制限がなく厚みのある試料の観察が可能
- 断面画像が得られるので血管径の計測が可能
- 圧力変化における微細な血管形状の変化を観察できた
 - 血管径の部位により圧力による影響が異なる
- 腎系球体周辺血管構造の3次元モデルの構築ができた

GFPマウス心臓の観察

- 発現遺伝子の3次元局在性の観察

既知の発現遺伝子に蛍光タンパク質をラベルした遺伝子組み換え体の体内での発現遺伝子の局在性を解明

観察試料・観察条件

観察試料

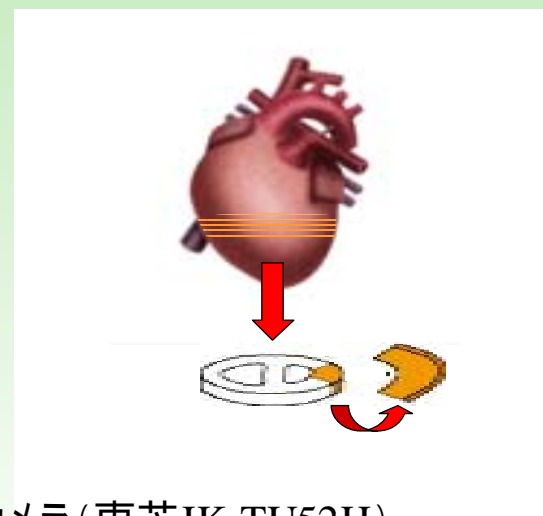
- 試料: アクチンプロモーターにEGFPを連結したGreenMice C57BL/6TgN(act-EGFP)OsbC14-Y01-FM131とBALB/cの産仔

→ PFA固定後PBS洗浄



観察条件

- 包埋方法: 凍結包埋(OCTコンパウンド SAKURA)
- 観察光: 白色・蛍光(トリプルバンド)・LSM
- レーザ波長: 488nm(Arガスレーザ)
- 出力: 75-200mW
- ナイフ: ミクロトーム用ナイフ C35 (FEATHER)
- スライス厚さ: 2.0 μm ・ナイフ回転速度: 90rpm
- 撮像カメラ: ICCD (浜松ホトニクス ICP300-DF) 3CCDカメラ (東芝JK-TU52H)
- 対物レンズ: 超長作動距離対物レンズM PLAN ApoSL x2 x20 (MITUTOYO)



觀察結果



白色光觀察 x2



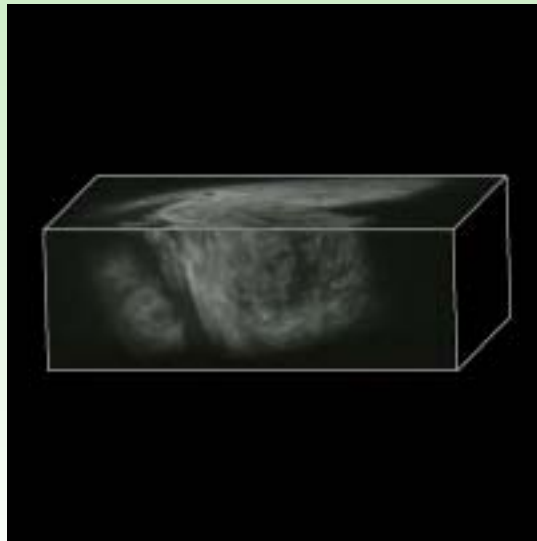
蛍光觀察 x2



白色 + 蛍光觀察 x2

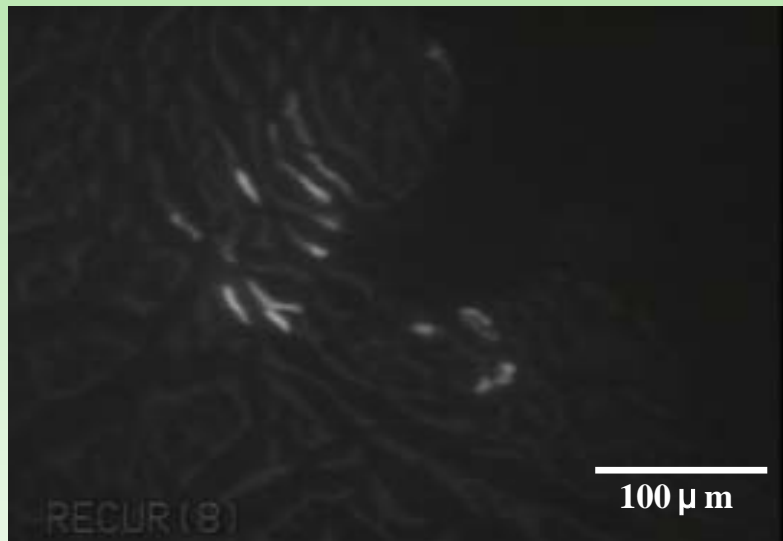


CLSM觀察 x2



立体構築画像 x2

観察結果



連続断面画像 × 20



任意断面立体構築画像 × 20

強発現部位の抽出



任意断面立体構築画像(疑似カラー) × 20

Resolution X:0.7 μ m Y:0.7 μ m Z:2 μ m

Area X:448 μ m Y:336 μ m Z:210 μ m

まとめ

- CLSM + 3DISMを組み合わせた装置を用いて個体内の発現遺伝子を観察
- GFP組み換え体の発現遺伝子の3次元局在を細胞単位で観察
- CLSMと比較し、観察範囲の制限がなく厚みのある試料の観察が可能
- 心臓のアクチン強発現部位を観察
- 観察速度が高速

結言

- 3D-ISMを用い各々の試料に適した観察法で観察することにより様々な試料のデジタル化を行うことが可能であった

提案手法は生物を対象とした微細な3次元構造の解析に有用である

- 得られたデータは3次元情報を持つためシミュレーションにも応用可能
- ポストゲノム時代の発現遺伝子の3次元局在と生体の構造の関係の解析にも有用

謝辞

本報告内の生体試料の観察では下記の研究者との
協力をいただいた

ここに記して謝意を表す

血管抽出法：電気通信大学 島井博行

GFPマウスの観察：

理研バイオリソースセンター 吉木淳

本研究で使用した遺伝子組み換えマウスは大阪大
学岡部教授より分与いただいた