

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460270

研究課題名(和文)新規のウラン代替染色剤を用いた新鮮組織三次元微細構造・機能の迅速電顕解析法

研究課題名(英文)A novel rapid three-dimensional analysis of the fresh tissues by low vacuum scanning electron microscopy using new electron stains alternative to uranium.

研究代表者

稲賀 すみれ (Inaga, Sumire)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：60116358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：従来のTEMによる電顕診断法とは異なった観点から、正常及び病理組織を用いた微細構造と機能の新たな電顕解析法の開発を行った。低真空SEMを用いて新規のウラン代替染色剤を検討した結果、観察目的に応じて染色剤を選択または組みあわせて、光顕における特殊染色法より短時間で簡単な手順で走査電顕レベル(～×30,000)の解析ができることが明らかとなった。また、本法は組織化学的検索法との併用も可能で、腫瘍細胞の内分泌顆粒の同定や核の異型性などの病理像を走査電顕レベルで解析できる簡便で迅速な組織診断法として有用であることが実証された。新規の電顕診断法として、今後、一般病理組織にも応用展開できると考えている。

研究成果の概要(英文)：From the point of view that is different from the conventional TEM, a novel rapid analysis method by low vacuum scanning electron microscopy (LVSEM) has developed using new electron stains alternative to uranium, which allowed detailed and efficient three-dimensional observations of normal and pathological tissue. The preparation process is considered to be simple and short time depending on the selection or combination of the stains, compare with the special staining in light microscopy (LM). In addition, the observation of endocrine granules or nuclear abnormalities in tumor tissues at higher magnifications (～×30,000) than LM is proved to be useful. Also the combination with histochemical method and the present LVSEM method is possible. It is considered that the application and development of the present method will be useful in the general pathological diagnosis, as a new electron microscopy diagnostic method in the future.

研究分野：解剖学、組織学

キーワード：ウラン代替染色剤 低真空SEM 白金ブルー 微細構造と機能 電顕診断法 迅速診断法 組織化学法
病理組織診断法

1. 研究開始当初の背景

(1) 電顕診断および術中迅速診断の状況

近年、確定診断のみならず疾患の進行度や予後の判定などにおいて重要な意義をもつ電顕診断の必要性が増しているにもかかわらず、TEM 試料(超薄切片)作製には専門的な知識と技術が必要、観察までに時間(1週間~数週間)がかかる、③電顕画像の解析が容易でない、高い検査費用がかかる、などの理由で、医療現場では、診断治療に迅速に反映できる、より簡便で迅速な電顕診断法が望まれていた。

一方、術中迅速診断は、新鮮な摘出組織をクリオスタットで凍結切片にしてから固定・染色し、光顕観察によって診断が行われているが、凍結・融解の過程で細胞の微細構造が破壊されたり、活性が減弱する問題があり、場合によっては診断が困難になることもある。また、術中迅速診断を電顕レベルで実施した例の報告はなかった。

(2) 研究経過と着想に至った経緯

申請者は、これまでにウラン代替染色剤として TEM、SEM いずれの観察にも利用できる新たな電子染色剤「白金ブルー」による染色法を開発し¹⁾、動物組織の光顕用パラフィン切片を細胞組織特異的に染め分け、低真空 SEM (反射電子検出型) を用いて反射電子シグナルのコントラストによって微細構造を最高 10,000 倍で詳細に三次元観察する手法を開発した²⁾。次いで、病理組織診断への応用を手がけ、最も電顕診断の機会が多い「腎生検標本」に着目し、光顕では観察不可能な糸球体の足細胞や足突起の表面形態の異常および基底膜などの病的な構造変異を三次元像として捉えることのできる方法を開発した³⁾。これらの方法は、さらに他の病理組織診断にも応用できる可能性を示唆した。

2. 研究の目的

本研究では、迅速な診断治療に反映できる簡便な電顕診断法の確立を目的とした。従来の TEM による電顕診断法とは異なった観点から申請者らがこれまでに開発してきた「低真空走査電顕を用いたパラフィン切片の迅速三次元解析法」をさらに発展させ新鮮組織を用いた微細構造と機能の新たな電顕解析法の開発を行う。最終目的は、病理組織像を走査電顕レベルで解析できる簡便で迅速な診断法を確立し、疾患の早期診断、早期治療につなげることである。

3. 研究の方法

先ず、新鮮組織の最適な試料作製方法を確立することを目的に、ラットおよびマウスから新鮮組織(肝臓、腎臓)を採取し、切片の厚さ、染色方法などを検討した。未

固定または固定した状態でリニアスライサーを用いて様々な厚さの切片を作製して、新規のウラン代替染色剤の一つである白金ブルーで切片を染色し、その細胞組織特異的な染色効果を利用して低真空 SEM で三次元像を直接観察し、最適な切片の厚さについて検討した。

次いで、術中迅速診断における低真空 SEM 下での細胞および組織の同定を目標として、パラフィン切片を用いた「低真空 SEM による組織像の迅速三次元解析法」を新規のウラン代替染色剤など様々な染色剤(白金ブルー、過ヨウ素酸メセナミン銀、酢酸ウラン、OTE、酢酸ガドリニウム、リンタングステン酸、オスミウム酸)を用いて動物(ラット、マウス)の正常組織(腎臓、脾臓、大腿骨)およびヒトの病理組織(腎生検、下垂体腺腫、肺癌、大腸癌、胃癌、乳癌、神経鞘腫)の切片を染色し、それぞれの染色効果の違いについて検討した。すなわち、染色後の切片を低真空 SEM にて直接観察し、目標とする細胞および組織の同定に利用可能な染色条件および観察条件について検討した。

4. 研究成果

固定試料の切片については、厚さ60~100 μm程度が適切であると思われたが、未固定試料のスライス技術的にかなり難しく、なかなか良い切片が得られず、未固定試料の最適な厚さについては今後さらに検討が必要である。また、イオン液体(導電性があり真空中でも蒸発しない)で処理してそのまま低真空 SEM で三次元像を直接観察する方法について検討したところ、イオン液体が残留してかえって試料の表面形態が観察しにくいことが分かった。しかし、濃度と処理時間を調整すればイオン液体を使用できる可能性がまだあると思われたので、引き続き条件を変えて検討したいと考えている。

また、ヒトの病理組織標本では、光顕レベルでは鑑別困難な特殊なネフローゼ症候群(Alport 症候群と菲薄基底膜病)における腎糸球体基底膜の微細な三次元構造を、表面を覆う細胞などを全く除去することなく観察できること(図1)や、内分泌腫瘍における細胞内の特殊顆粒の三次元形態やサイズを高倍率(~×30,000)で明瞭に識別、計測できること(図2)が実証でき、重金属染色を用いた低真空 SEM 観察による細胞および組織構造物の同定法が臨床診断に有用である可能性が示唆された。さらに、組織化学的検索法を検討するために、マウスの摘出腎およびヒトの腎生検組織のパラフィン切片、ヒトの摘出癌組織(乳癌、肺癌、大腸癌)のパラフィン切片を用いて、免疫染色の DAB 発色法にオスミウム酸による増感法を施した標本と、白金ブルーだけで染色した標本とを低真空 SEM で比較観察した(図

3)。その結果、診断のポイントとなる核の形態、基底膜の有無、細胞内の特殊顆粒の形状など、光顕レベルでは観察困難な構成要素を低真空SEMでは高倍率(~ ×30,000)で明瞭に観察することが可能であった。鑑別診断が難しい症例において低真空SEMと組織化学的検索法との併用は有用な組織解析法となる可能性が示唆された。

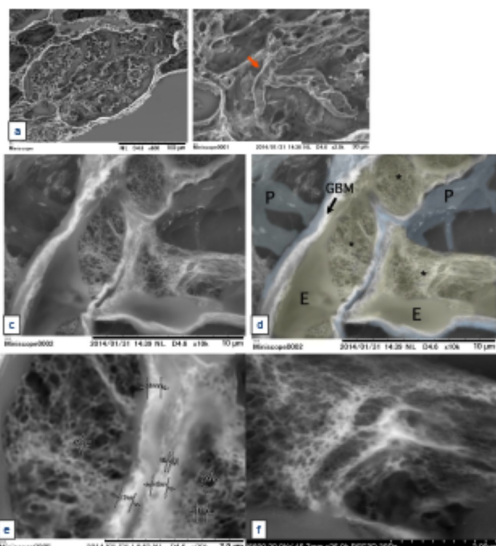
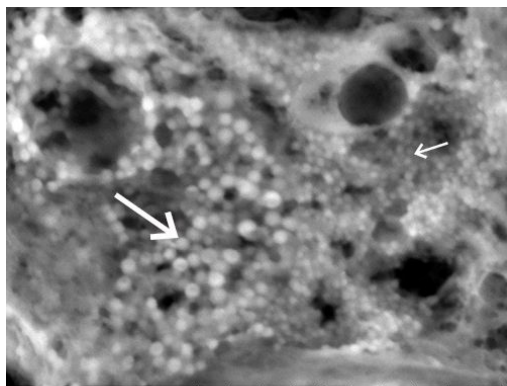


図1.GBMの網目構造が明瞭な糸球体の低真空SEM像 (Alport症候群:PAM染色)



<下垂体腺腫パラフィン切片の低真空SEM像> x10k 10 μm

図2.下垂体腺腫のパラフィン切片の低真空SEM像(白金ブルー染色)。細胞によって異なるサイズの顆粒(大小矢印)が観察される。

一方、細胞および組織の同定を目標とした新規のウラン代替染色剤を含む重金属染色による電子染色効果(反射電子シグナルの違い)を低真空SEM下で比較観察した結果、三次元像と共に電子染色剤それぞれの染色特性による異なった明暗のコントラスト像が描出され、低真空SEM観察法では、光顕観察における特殊染色法より短時間で簡単な手順で組織像の解析ができることが明らかとなった。

本研究の結果は、新規のウラン代替染色剤法を観察目的に応じて選択または組みあわせることによって、固定組織やパラフィン切片では低真空SEM下において分泌顆粒の同定

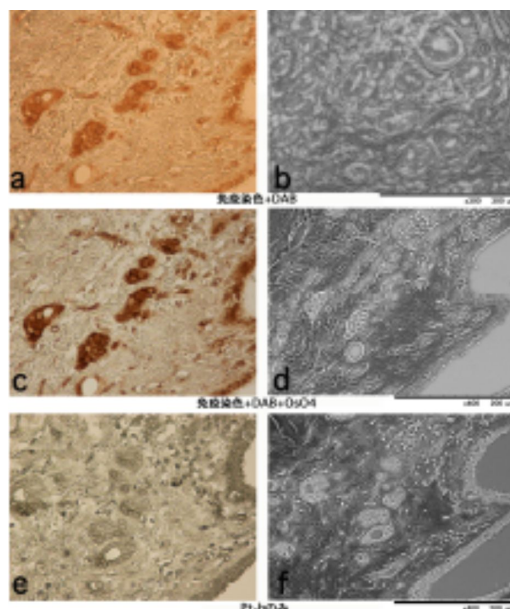


図3.乳癌組織の光顕像(左列:a,c,e)と低真空SEM像(右列:b,d,f)。DAB発色標本(a,b)にオスmium酸増感処理を施したもの(c,d)、白金ブルーのみ(e,f)で染色したものを比較。

や核の異型性の三次元的な構造解析することを可能にし、光顕だけでは鑑別が難しい腫瘍組織などにおいても、走査電顕レベルで解析できる簡便で迅速な診断法として有用である可能性を示唆した。今後、新規の電顕診断法として、一般病理組織にも応用展開できると考えている。

<引用文献>

Inaga, S et al., Platinum blue as an alternative to uranyl acetate for staining in transmission electron microscopy. Arch. Histol. Cytol. 70 (1): 43-49 (2007)

Inaga, S. et al., Low vacuum scanning electron microscopy for paraffin sections by utilizing the differential tissues stainability of cells and with platinum blue. Arch Histol Cytol 70: 43-49 (2009)

Inaga, S. et al., Rapid three-dimensional analysis of renal biopsy sections by low vacuum scanning electron microscopy. Arch. Histol. Cytol, 73: 113-125 (2010/2011)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Sumire Inaga, Masako Kato, Masako Nishimura, Kaori Ichikawa, Toshio Kameie, Hironobu Nakane, Kazuhiko Hayashi and Toshiyuki Kaidoh.

Three-dimensional ultrastructural analysis of secretory granules in histological paraffin sections of endocrine tumors using low-vacuum SEM. *Microscopy*.64 (suppl 1) (Tokyo): 138, (2015) (査読なし)
DOI:10.1093/jmicro/dfv328

稲賀すみれ、亀家俊夫、中根裕信、名黒知徳、海藤俊行、
低真空 SEM を用いた腎生検パラフィン切片の迅速三次元解析法。
顕微鏡 49 : 147-151 (2014) (査読あり)
http://www.microscopy.or.jp/magazine/49_2/pdf/49-2-147.pdf

Shinichi Okada, Sumire Inaga, Koichi Kitamoto, Yasuo Kawaba, Hironobu Nakane, Tomonori Naguro, Toshiyuki Kaidoh and Susumu Kanzaki .
Morphological diagnosis of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy by low vacuum scanning electron microscopy.
Biomedical Research 35(5) : 345-360 (2014) (査読あり)
DOI:10.2220/biomedres.35.345

Shinichi Okada, Sumire Inaga, Yasuo Kawaba, Takuya Hanada, Atsushi Hayashi, Hironobu Nakane, Tomonori Naguro, Toshiyuki Kaidoh and Susumu Kanzaki .
A novel approach to the histological diagnosis of pediatric nephrotic syndrome by low vacuum scanning electron microscopy.
Biomedical Research .Vol.35 (4): 227-236 (2014) (査読あり)
DOI:10.2220/biomedres.35.227

[学会発表](計12件)

稲賀すみれ、加藤雅子、市川 薫、西村雅子、亀家俊夫、中根裕信、海藤俊行、
低真空SEMによる細胞組織の三次元微細構造解析のための電子染色効果の比較。
第121回日本解剖学会、2016年03月28～30日
「ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)」

Sumire Inaga, Masako Kato, Masako Nishimura, Kaori Ichikawa, Toshio Kameie, Hironobu Nakane, Kazuhiko Hayashi and Toshiyuki Kaidoh,
Three-dimensional ultrastructural analysis of secretory granules in histological paraffin sections of endocrine tumors using low-vacuum SEM. The 2nd East-Asia Microscopy Conference (EAMC2) (第2回東アジア顕微鏡学会) (国

際学会) 2015年11月24～27日、「姫路商工会議所(兵庫県姫路市)」

岡田 晋一、稲賀すみれ、横山浩己、山田祐子、北本晃一、河場康郎、中根裕信、海藤俊行、神崎 晋、
Alport 症候群の腎障害進行における糸球体上皮細胞の意義。
日本小児腎臓病学会学術集会 第50回記念大会2015年06月18～20日「神戸国際会議場(兵庫県神戸市)」

Shinichi Okada, Sumire Inaga, Yuko Yamada, Koichi Kitamoto, Yasuo Kawaba, Hironobu Nakane, Toshiyuki Kaidoh and Susumu Kanzaki,
Morphological alterations of podocytes in Alport syndrome investigated by low vacuum scanning electron microscopy. 52th ERA-EDTA Congress (第52回欧州腎臓学会) (国際学会) 2015年05月28～31日「ロンドン(イギリス)」

西村雅子、泉恵子、稲賀すみれ、
低真空 SEM を用いた大腿骨パラフィン切片の観察。
第71回日本顕微鏡学会 2015年5月13～5日、「京都国際会議場(京都府京都市)」

稲賀すみれ、加藤雅子、西村雅子、市川薫、亀家俊夫、中根裕信、海藤俊行、
組織パラフィン切片における細胞内分泌顆粒の低真空 SEM による解析。
第71回日本顕微鏡学会 2015年5月13～15日「京都国際会議場(京都府京都市)」

Sumire Inaga, Shinichi Okada, Masako Nishimura, Toshio Kameie, Hironobu Nakane, Tomonori Naguro, Susumu Kanzaki and Toshiyuki Kaidoh,
Three-dimensional morphological analysis of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy by low vacuum scanning electron microscopy. 第120回日本解剖学会2015年3月21～23日
「神戸国際会議場(兵庫県神戸市)」

岡田晋一、稲賀すみれ、北本晃一、河場康郎、
低真空走査型電子顕微鏡を用いたAlport症候群と菲薄基底膜病の鑑別。
第57回日本腎臓学会2014年7月4～6日「パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)」

岡田晋一、稲賀すみれ、山田祐子、北本晃一、河場康郎、中根裕信、名黒知徳、海藤俊行、神崎 晋、
低真空走査型電子顕微鏡を用いたAlport症候群の新規簡易診断法。

第49回小児腎臓病学会2014年6月5～7日「秋田ビューホテル(秋田市)」

稲賀すみれ、岡田晋一、西村雅子、亀家俊夫、北本晃一、河場康郎、神崎晋、中根裕信、名黒知徳、海藤俊行、
細胞を除去せずに腎系球体基底膜の三次元構造解析を可能にする低真空SEM観察法。
第70回日本顕微鏡学会2014年5月11～13日「千葉幕張メッセ(千葉県千葉市)」

稲賀すみれ、加藤雅子、林一彦、亀家俊夫、中根裕信、名黒知徳、海藤俊行、
組織化学的検索法を併用した低真空SEMによる三次元解析法の病理組織への応用。
第119回日本解剖学会総会2014年3月27～29日「自治医科大学(栃木県上野市)」

Sumire Inaga, Masako Kato, Shinichi Okada, Mari Sakaue, Toshio Kameie, Tetsuo Katsumoto, Hironobu Nakane, Keiichi Tanaka, Susumu Kanzaki, Kazuhiko Hayashi, Tomonori Naguro and Toshiyuki Kaidoh.

A novel approach by low vacuum scanning electron microscopy to the clinical pathology of human glomerular diseases using conventional renal biopsy sections. ISMS2013(国際形態科学シンポジウム2013)2013年9月10～13日「新潟朱鷺メッセ(新潟県新潟市)」

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
稲賀すみれ (INAGA Sumire)
鳥取大学・医学部・講師
研究者番号：60116358

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
加藤雅子 (KATO Masako)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号：80221183

岡田晋一 (OKADA Shinichi)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号：50343281