

令和 6 年 6 月 1 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20741

研究課題名（和文）光-電子相関顕微鏡観察のための3次元ターゲティング法の開発

研究課題名（英文）Efficient targeting method for correlative light and electron microscopy

研究代表者

吉村 安寿弥（Yoshimura, Azumi）

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90467340

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：光学顕微鏡、電子顕微鏡試料中で検出できる蛍光標識を用いて、目的領域を段階的に絞り込むターゲティング法の原理実証実験を行った。光学顕微鏡、連続切片撮影法（アレイトモグラフィー）を用いることで、電子顕微鏡試料調製前後の蛍光標識の位置を取得し相関した。その結果、光学顕微鏡のみを用いたターゲティングが可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

立体的に大きな試料における光-電子相関顕微鏡法（CLEM）には、目的領域のターゲティングに先端的設備を要する、電子観察のデータサイズが増大しスループットが低くなるなどの問題点がある。本課題で実現されたターゲティング法は、一般的な蛍光観察のみを用いて実行可能なもので、手法の簡略化、自動化を図り汎用性を高めることで、3次元でのCLEMを効率化することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Correlative light and electron microscopy (CLEM) enables correlation of molecular and structural information and allows qualitative and quantitative analysis of regions of interest (ROI) specified by light microscopy. The correlation however becomes challenging as the specimen size increases, due to the difficulty in ROI targeting after EM sample preparation. This study aims to develop an efficient ROI targeting method for CLEM that can be performed with widely used fluorescence microscopy. Using a fluorescent label detectable both before and after EM samples preparation, landmark structures were introduced. Based on their positions detected by fluorescence microscopy at different steps of the sample preparation, step-wise ROI targeting was achieved.

研究分野：光-電子相関顕微鏡法

キーワード：電子顕微鏡 光-電子相関顕微鏡法

1. 研究開始当初の背景

医学生物学研究において、光-電子相関顕微鏡法 (**CLEM**) は盛んに使用される重要な手法である。**CLEM** では蛍光顕微鏡観察で得られる分子情報を、電子顕微鏡観察で得られる形態情報に相関させることで、目的の領域を正確に限定した定性・定量解析が可能となる。また、蛍光標識の位置情報をもとに、微小な目的領域を探し当てる (ターゲティング) にも使用され、**CLEM** は目的構造が試料中で極めて希少な場合にも大変有効な手法である。更に、近年普及しつつある連続断面観察法である **3** 次元電子顕微鏡法 (ボリューム **EM**) を用いれば、電子顕微鏡の自動撮影機能によって効率的なデータ取得ができるため、試料全体の蛍光・電子データの **3** 次元相関が可能となる。

しかし、試料が立体的に大きくなるほど蛍光顕微鏡で取得した領域の全てを電子顕微鏡で捉えることは難しくなる。組織などでは数千枚の連続断面像が必要となる例も少なくなく、一般的な設備での実施は現実的ではない。また、組織などの試料では蛍光顕微鏡でも観察可能な範囲は限られるため、通常はその一部分のみを撮影する。そのため、蛍光観察で特定した細胞、オルガネラなど、微小な一部の領域を、電子顕微鏡試料調製後に探し出す必要がある。しかし、重金属による固定・染色後に樹脂包埋された試料中では、一般的に普及している蛍光標識は消光してしまうため、ターゲティングなしには電子観察はできない。組織試料の表面にみられる形態的な特徴を用いて蛍光観察した位置を特定する方法も用いられるが、固定・染色によって組織は黒化するため、組織の種類によってはターゲティングに使用できる形態的な特徴が失われ、位置を特定することが困難となる。このような問題を解消するために **X** 線顕微鏡による高解像度コンピューター断層撮影 (**X** 線マイクロ **CT**) を **CLEM** と組み合わせる手法が使用されている。電子顕微鏡試料の **3** 次元 **X** 線データをもとに正確に目的領域を絞り込むことで、電子顕微鏡撮影が必要な領域を大幅に狭めることが可能となっている。しかしこの手法には先端的設備が必要であり、ルーティンにワークフローに取り入れることができる研究機関はまだ限られているのが現状である。このような状況から、一般に普及しているイメージング装置のみを用いて実施できるターゲティング法が求められており、その手法には需要が見込まれると考えた。

2. 研究の目的

研究代表者は、広く普及している蛍光観察のみを用いて、効率的に目的領域を絞り込む **3** 次元ターゲティング法を開発することを目標としている。具体的には、一般に普及しているイメージング装置を用いて誰にでも実行可能であること、試料の種類やターゲティングが必要な領域の大きさにかかわらず使用できる汎用性の高いワークフローとして提供することを目指している。本研究課題では、その第 **1** 段階として原理を実証し、ターゲティング精度、汎用性を評価することを目指した。

3. 研究の方法

光学顕微鏡、電子顕微鏡試料中で検出できる蛍光標識をランドマークとして試料中に加えて試料を作製し、標識の位置を基準に目的領域のターゲティングを行う方法を確認することを目指した。具体的には、試料作製の複数の段階において蛍光ランドマークの位置を取得し、段階的にターゲット領域を絞り込むためのワークフローを決定するために、以下の方針で開発を行った。

(1) 蛍光標識によるランドマーク、試料作製条件の検討

光学顕微鏡、電子顕微鏡試料中で検出できる蛍光標識はこの手法にとって重要となる。予備実験として、化学固定、染色、樹脂包埋を行った電子顕微鏡試料中における蛍光シグナルの検出を評価し、蛍光ランドマークの査定を行った。また、一般的に使用される複数の固定・染色方法の影響を評価した。次に、様々な用途に適用できる汎用性の高いワークフローを目指し、蛍光ランドマークのサイズと使用する樹脂超薄切片の厚さとの関連を検討した。

(2) 蛍光ランドマークの位置情報取得

(1) で最適化した試料作製条件をもとにテスト試料を作製し、蛍光ランドマークの観察条件を検討した。試料作製の複数段階において蛍光像を取得し、ターゲティングに必要な位置情報を取得できるかを検討した。

(3) 連続超薄切片作製、アレイトモグラフィーによる検証

ポリウム **EM** 技術の中でアレイトモグラフィーでは、樹脂ブロック表面からシグナルを得る他の手法 (**SBF-SEM**、**FIB-SEM**) とは異なり、試料の連続超薄切片をシリコンウエハやガラスなどの基板上に回収するため、切片は半永久的に保管ができる。多数の連続切片を回収する必要があるものの、目的に合わせて撮影位置や枚数を柔軟に決定でき、再撮影も可能である。そこでまず連続超薄切片を作製してガラス基板上に回収し、光学顕微鏡を用いたアレイトモグラフィーによるターゲティングの検証を行った。

4. 研究成果

(1) 蛍光標識によるランドマーク、試料作製条件の検討

光学顕微鏡、電子顕微鏡試料中でシグナルが検出できる赤色蛍光標識を採用し、予備実験として電子顕微鏡試料中における蛍光シグナルの検出を評価した。具体的にはランドマークとして試料中に導入し、四酸化オスミウム、タンニン酸、酢酸ウラン等による一般的に電子顕微鏡試料作製に用いられる固定染色を行った。その結果、固定染色が強いほど蛍光シグナルは低下する傾向があった。そのため、テスト試料の調整には四酸化オスミウムのみを用いることとした。次に最適な蛍光ランドマークのサイズと目的とする断面の厚さの関連を、連続超薄切片を作製して検討した。その結果、目標とする切片厚の 4 倍以上の標識構造を使用することが、特に薄切後の段階におけるランドマークの識別に有効であることが分かった。

(2) 蛍光ランドマークの位置情報取得

研究の計画段階では蛍光ランドマークから座標情報を得ることを目指していたが、試料作製の複数段階において座標を正確に決定して相関することは容易ではなかった。特にオスミウムによる固定後は標識自体の蛍光の低下に加え、試料の黒化により、蛍光シグナルの検出効率が低下し、十分な数のランドマークの位置を特定することができなかった。一方、薄切後は蛍光シグナルの検出がある程度可能であった。そこで超薄切片において目的領域を特定する方針に変更し、アレイトモグラフィーを用いて検証を進めることとした。

(3) 連続超薄切片作製、アレイトモグラフィーによる検証

アレイトモグラフィーを用いるにあたり第一に、連続超薄切片の光学顕微鏡画像から得られたシグナルを用いて 3 次元相関を行うための方法を検討した。連続超薄切片の光学顕微鏡画像を取得し、蛍光ランドマークと切片を含む 3 次元スタックを作成した。オープンソースのプログラムである **Image J** を用いた画像処理により、蛍光ランドマークと切片を抽出し、画像のスタック作成、アライメントを行った。次に、電子顕微鏡試料作製前後に取得した光学顕微鏡像との相関を行い、目的領域の絞り込みを行った。その結果、細胞レベルの領域の特定には十分であることが示された。データ相関に必要な一連のフローの簡略化と自動化が課題であるが、蛍光ランドマークとアレイトモグラフィーを用いることで、ターゲティングが可能であることが示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------