

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：37104
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659104
 研究課題名（和文） 生体組織メゾスケール 3 次元解析のための FIB 連続切削 SEM 表面組成観察法の最適化
 研究課題名（英文） Optimization of FIB/SEM techniques - the novel ultrastructure analysis by combination of serial thin ablation and block surface material contrast observation - for biomedical mesoscale three dimensional structural analysis.
 研究代表者
 中村 桂一郎 (NAKAMURA KEI-ICHIRO)
 久留米大学・医学部・教授
 研究者番号：20172398

研究成果の概要（和文）：

新規概念に基づく顕微装置 (focused ion beam/scanning electron microscope; FIB/SEM) の医学生物学研究応用における最適化により、肝細胞ミトコンドリアの cristae junction の発見、精嚢壁間質にみられる間葉細胞の扁平な形態の証明とそれらによる機能的区画化 “compartmentalization” という概念の提唱、皮膚真皮の生理および病態における線維芽細胞と膠原線維束構築の解析、骨膜および腱骨付着部の力学的妥当性を示す細胞構築の視覚化など、細胞小器官から細胞・組織構築レベルに至る多くの形態的新事実を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In order to apply the novel scanning electron microscope technique, FIB/SEM (focused ion beam/ scanning electron microscope), fully and effectively in the biomedical structural researches, we have attempted to optimize the capacity of the instrument and the analytical methods. We have published a paper on the mitochondrial cristea junctions which have not clearly proved because of the difficulty of visualization of those functionally important structures. In the seminal vesicular wall, we have also showed that the stromal cells which possess supposedly stellate appearance are in fact flat sheet like shape, constructing functional “compartmentalization”. Other studies are on the way and papers are under preparation about the new findings.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：電子顕微鏡・FIB/SEM・超微細構造・三次元再構築・ミトコンドリア・間葉細胞・線維芽細胞・compartmentalization

1. 研究開始当初の背景

昨今、レーザー技術の発展や光子検出器の高感度化に伴って高機能の共焦点レーザー顕微鏡や多光子レーザー顕微鏡が開発され、光顕レベルの詳細な形態観察が可能となった。試料作製法のイノベーションにより生きた細胞・組織、また、ミトコンドリア等の細胞内小器官の空間的・時間的連続観察も可能となってきた。しかし、たとえレーザーを使用しても光顕レベルの分解能には限界があり、医学生物学研究により微細な構造の高分解能観察が必須であることは指摘されてきたにもかかわらず、それを実現する電顕観察は、多くの時間と高度な技術を要する超薄切片作製と染色技術が必要であり、正面から微細形態解析に取り組んだ研究は少ない。そのような技術的困難の克服が期待されるのが、次世代走査型電子顕微鏡 (SEM) である。しかしながら、2006 年より論文報告があるものの国内において医学生物学研究に特化した研究例はなかった。この顕微観察法はもともと非生物系の研究分野で金属や高分子化合物の微細形態および様々な環境下における物質動態を観察するために開発されてきた新規手法であり、国内において医学生物学研究への適応はほとんどない。そのような状況の中、2010 年度に私立学校私設整備費補助金を得て本装置が設置された久留米大学において、それまでは方法的に不可能であった骨など硬組織の観察を試みていたところ、本手法が医学生物学研究において極めて重要な役割を果たすものとなることを強く認識し、より広く生命科学への最適な適応を可能とする方法の開発を模索していたものである。

2. 研究の目的

本研究計画では、我々のこれまでの電子顕微鏡による形態研究実績に照らし、大きな柱として次の 2 点を目的とし、さらに凍結した脆弱な試料の観察法の開発も試みた。

(1) 透過型電子顕微鏡 (TEM) 像に匹敵する画像の取得を SEM にて実現すること：まずは電顕観察の定法である樹脂包埋試料を対象として、それらの切削面を本装置の反射電子モード観察し (back scatter imaging; BFI)、染色等の試料作製法および SEM 観察条件の最適化を図った。これにより広範囲の試料面について超微細構造観察が可能となる。

(2) 集束イオンビーム (focused ion beam; FIB) 切削による超薄切削面画像の連続取得と 3 次元再構築：エポン包埋された生物試料の切削の最適条件を探ると共に、そこから得られた連続画像に含まれる膨大な画像データの解析の開発・改良が重要な課題であることが明らかとなった。

(3) 脆弱な生物試料のその場観察法の開

発：バイオフィームのような乾燥に耐えない脆弱な試料を凍結試料として FIB により繊細な切削・加工により実現する観察法の開発も目標の一つとした。

以上について、電顕観察を日常の作業とし、様々な臓器・組織の電顕観察手技を熟知している我々のチームにおいて、適正の観察条件を見出すことを期待した。

3. 研究の方法

様々な臓器・器官の結合組織、上皮組織、また、筋組織、神経組織について、FIB/SEM により最も適切な三次元微細構造観察を実現し、最適な画像が得られる方法を確立するために、対象とする細胞、組織、臓器毎に、エポン包埋する個別の細胞や組織試料について、様々な固定法と最適の BFI 画像を得るための電子染色法の開発・改良を行った。次に、FIB/SEM によるエポン包埋試料について、連続超薄切削・画像取得の最適化を試みた。

(1) 固定法の検討

① 化学固定：グルタルアルデヒド固定に続き、オスミウム、チオカルボヒドライド、鉛を用い、数種の配合比でもって後固定を行うこと。

② 凍結固定：脆弱なバイオフィームの SEM 観察および原始バクテリアの FIB/SEM 観察試料作製法の開発

(2) ブロック染色法の開発；(1) ①の詳細

① オスミウム・ウラン・鉛によるブロック染色

② オスミウム・チオカルボヒドライド・オスミウムの順次ブロック染色

③ 凍結試料のブロック染色

(3) 単一または連続画像取得のための装置開発・改良

① 広範囲観察のための高精度切削 (ダイヤモンドナイフによる切削)

② 連続切削の為の角度との整合性を得るための装置の開発

(4) 連続画像解析法の開発・改良

① PC および画像解析ソフトの評価と導入

② セグメンテーション (視覚的判断、半自動判断、自動判断) の試行

③ 3 次元再構築と PC による表現法の検討

(5) 細胞・組織・臓器・器官に特化した観察と解析：以上の手法により、これまで必ずしも明らかでなかった各細胞・組織について、以下の項目に特化した解析を試みる。

① 肝細胞ミトコンドリア

② 精嚢間質細胞

③ 皮膚真皮の細胞および膠原線維束による組織構築

④ 頭蓋骨骨膜・腱骨付着部の組織構築

⑤ バイオフィーム観察

4. 研究成果

分解能や超薄切片の厚さに埋没するサイズの構造や微細構造を適切に反映する組成コントラストを得るブロック染色法を解析対象(ミトコンドリア、管腔臓器壁、皮膚、骨・軟骨と腱・靭帯境界面)にあわせて適宜調節することにより、これまでは観察が難しかった微細構造を明確に捉えることができた。

(1) ブロック染色法は、いずれの臓器においても、オスミウムとチオカルボヒドライドをベースに、ウラン、鉛を用いることにより、然るべきコントラストを得ることのできる標準的試料作製法を確率することができた。

(2) ミトコンドリア；肝細胞のミトコンドリアを連続超薄切片画像の再構築により解析したところ、通常の超薄切片(厚さ約70nm)の電顕観察ではその厚さに埋もれて観察が難しかった cristae junction を明瞭に描出することができた(Ohta et al., Micron 2012)。

(3) 間葉の間質細胞；精嚢壁平滑筋層内および近傍に分布する間質細胞を微細再構築像として解析したところ、個々の細胞はこれまで考えられていたような星型ではなく、扁平であること、さらにそれらが隔壁をなすように配置して、上皮・間葉境界や平滑筋層内において一定の区分けをする“compartmentalization”と呼べる組織・細胞構築をなす事が明らかとなった。

(4) 皮膚真皮；真皮において隣接する線維芽細胞はお互い接触し、全体として細胞ネットワークを形成していること、さらには、これまでの1断面の観察ではうかがい知ることのできなかったそれら細胞とマクロファージ様細胞の密接な関係が明瞭に示された。臨床的に重要な所見として、ケロイドと肥厚性癬痕の形態的相違点を明確にできる可能性が示された。さらに、iPS細胞の母胎として注目される皮膚線維芽細胞や、体性幹細胞のニッチとしての役割の可能性等、再生医学医療分野研究も興味深い。

(5) ラット頭蓋骨を貫く膠原線維束が、骨表面にそって分布する膠原線維束ネットワークに連結しており、骨芽細胞や骨膜の鋸着装置としての役割を果たすことが示唆された。また、肩関節腱骨付着部において、骨・軟骨・腱の付着部を構築する細胞の形態を明確に観察することにより、正常と人為的に再建した構造の違いを明確にした。いずれも、硬組織を含むためこれまでの方法では解析が容易ではなかった領域であり、本方法の応用により初めて可能となった研究である。

(6) バイオフィルムの観察：観察対象構造の脆弱性のため、これまで電子顕微鏡観察が難しかったバイオフィルムの観察を実現し、

論文発表した (Uemura et al., J Infect Chemother 2013)。

このように、広範囲にわたる組織の微細構造の観察、および、100 μ m四方の領域についてZ軸方向の連続画像取得を可能とするFIB/SEMを医学生物学研究に応用することにより、これまでは解析不可能であった細胞・組織の3次元微細構造を明らかにすることができるようになり、多くの新たな知見を得つつある。適正な組成コントラストを得るための新装置の提案およびミトコンドリア cristae junction についての報告、および、バイオフィルム観察の報告はすでに学術雑誌に掲載されており(上述)、また、その他の組織の研究については、各テーマ共に研究代表者、分担研究者および大学院生らにより学会発表を行い、論文作成中である。また、学会および学術雑誌における公開により、本顕微技法の有用性および形態科学分野における意義について認知されるようになり、学会等からのシンポジウム、特別講演への招待も多い。

今後、他の細胞、組織、臓器・器官について、順次、すみやかに研究を進めるために残された大きな課題として、個々の研究対象について得られた膨大なシリーズデータをいかに迅速かつ適切に解読するかという問題があることが明らかとなってきた。我々の研究活動の発表・交流の場である日本顕微鏡学会において、平成25年度より新規研究部会として3年間の活動の機会をいただいた。この研究部会において、類似のBFI観察および3次元微細構造再構築技法を目指す若手研究者が集い、いくつかの新規電顕技法についてそれぞれの問題点を洗い出し、さらなる発展を目指す準備が整いつつある。これも本研究計画の大きな成果の一つであると言えると思う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計13件)

(1) Tanoue R, Ohta K, Ogasawara S, Yano H, Kusakawa J, Nakamura K, Bone marrow stromal cells cause subcutaneous fibroblasts to differentiate into osteocytes in a physically statial micronment in rats. Acta Histochemica 115, 512-518, 2013 (査読有り)

DOI:10.1016/j.acthis.2012.11.007

(2) 田上隆一郎、平嶋伸悟、金澤知之進、吉富宗健、太田啓介、中村桂一郎、楠川仁悟。副甲状腺ホルモン間の投与がラット皮下異所性骨モデルに与える影響。久留米医学会誌。76(1.2) 34-41, 2013 (査読有り)

(3) Nogita H, Ohta K, Hisaka T, Nakayama M, Akashi M, Etoh D, Kawashima Y, Kawahara R, Ishikawa H, Yasunaga M, Horiuchi H, Nakamura K, Kinoshita H, Shirouzu K. Objective Detection for Biliary Tract Carcinoma Using Autofluorescence Imaging. *Abdominal Oncology* 2013; 1:00-00 doi 10.5754/AB 13004 (査読有り)

(4) Uemura Y, Qin L, Gotoh K, Ohta K, Nakamura K, Watanabe H. Comparison study of single and concurrent administrations of carbapenem, new quinolone, and macrolide against in vitro nontypeable *Haemophilus influenzae* mature biofilms. *J Infect Chemother*, 2013 DOI 10.1007/s10156-013-0598-5 (査読有り)

(5) 太田啓介, 中村桂一郎. TEM像に迫る, リターディング法を用いた樹脂包埋生物標本のSEM反射電子観察とFIB/SEMトモグラフィへの応用. *顕微鏡*, 47(3)176-180, 2012 (査読有り)

(6) 太田啓介, 都合亜記暢, 東龍平, 中村桂一郎. 新型電子顕微鏡FIB/SEMによる医学・生物学-超微形態解析法の新展開: Structome. *久留米医会誌* 75(1.2)1-10, 2012 (査読有り)

(7) Ohta K, Shoji S, Togo A, Higashi R, Tanoue R, Nakamura K. Beam deceleration for block-face scanning electron microscopy of embedded biological tissue. *Micron* 43, 612-620, 2012 (査読有り)

(8) Tanoue R, Ohta K, Kusukawa J, Nakamura K. The effect of the microenvironment created by a titanium mesh cage on subcutaneous experimental bone formation and inhibition of absorption. *Cells Tissues Organs* 196:221-230, 2012 (DOI:10.1159/000334409) (査読有り)

(9) Hashitani H, Mitsui R, Shimizu Y, Higashi R, Nakamura K. Functional and morphological properties of pericytes in suburothelial venules of the mouse bladder. *British J Pharmacol* 167:1723-1736, 2012 DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02125.x (査読有り)

(10) Oba T, Yasukawa H, Hoshijima M, Sasaki KI, Futamata N, Fukui D, Mawatari K, Nagata T, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Nakamura K, Kang D, Yajima T, Knowlton KU, Imaizumi T. Cardiac-Specific Deletion of SOCS-3 Prevents Development of Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 59, 838-852, 2012 (査読有り)

(11) Ishibashi Y, Yamagishi S, Matsui T, Ohta K, Tanoue Ryuichiro, Takeuchi M, Ueda S, Nakamura K, Okuda S. Pravastatin inhibits advanced glycation end products (AGEs) - induced proximal tubular cell apoptosis and injury by reducing receptor for AGEs (RAGE) level. *Metabolism* 61, 1067-1072, 2012 (査読有り)

(12) Ohta K, Higashi R, Sawaguchi A, Nakamura K. Helical arrangement of filaments in microvillar actin bundles. *J Struct Biol* 177, 513-519, 2012 (査読有り)

(13) 太田啓介
「電子顕微鏡用包埋剤」～電子顕微鏡の画質をよくする新素材～
MATERIAL STAGE 2012.6. pp57-60

[学会発表] (計 24 件)

(1) 都合亜記暢, 東龍平, 川本晃大, 太田啓介, 柳田敏雄, 中村桂一郎, 急速凍結凍結置換試料のためのFIB/SEMトモグラフィ観察用 en bloc 染色法, 第 69 回日本顕微鏡学会全国学術集会 (ポスター発表), 2013 年 5 月 20 日～22 日, 大阪

(2) 太田啓介, FIB-SEM を用いた連続ブロック表面観察による生物組織のメゾスケール 3 次元形態観察. 第 69 回日本顕微鏡学会全国学術集会 (シンポジウム; 招待講演), 2013 年 5 月 20 日～22 日, 大阪

(3) 中村桂一郎, 林篤正, 東龍平, 都合亜記暢, 武谷三恵, 岡山聡子, 金澤知之進, 太田啓介, 鷹野誠, 間葉細胞は組織の区画化に重要な役割を果たす: FIB/SEM による超微形態解析, 第 90 回日本生理学会大会 (シンポジウム; 講演) 2013 年 3 月 27 日, 東京

(4) 平嶋伸悟, 太田啓介, 金澤知之進, 田上隆一郎, 都合亜記暢, 楠川仁悟, 中村桂一郎, FIB/SEM を用いたラット骨-骨膜間の 3 次元超微形態構造解析. 第 118 回日本解剖学会全国学術集会 (ポスター発表) 2013 年 3 月, 高松

(5) 金澤知之進, 太田啓介, 東龍平, 都合亜記暢, 中村桂一郎, FIB/SEM トモグラフィを用いた、ラット腱板正常付着部/縫合後腱骨間の超微形態観察. 第 118 回日本解剖学会全国学術集会 (ポスター発表) 2013 年 3 月, 高松

(6) 太田啓介: Dual Beam 装置 (FIB/SEM) を用いた細胞・組織の 3 次元メゾスケール構造解析. 第 118 回日本解剖学会全国学術集会 (ランチオンセミナー; 講演) 2013 年 3 月, 高松

(7) 都合亜記暢, 東龍平, 川本晃大, 太田啓介, 中村桂一郎, 凍結置換試料の en bloc 染色法の試み, 第 54 回日本顕微鏡学会九州

支部評議員会・総会および学術講演会（口頭発表）2012年11月10日、別府

(8) 中村桂一郎、東龍平、太田啓介、FIB/SEMによるモルモット精嚢の間質細胞の観察：細胞形態の新たな展開について、第54回日本顕微鏡学会九州支部評議員会・総会および学術講演会（口頭発表）2012年11月10日、別府

(9) 金澤知之進、太田啓介、東龍平、都合亜記暢、中村桂一郎、ラット棘上筋腱附着部の超微形態における機能解剖学的構造解析。第68回日本解剖学会九州支部学術集会（口頭発表）2012年10月13日、久留米

(10) 太田啓介、鈴木英紀、都合亜記暢、岡山聡子、中村桂一郎、FIB/SEMを用いたトロンビン刺激による血小板構造変化の定量解析への試み。第68回日本解剖学会九州支部学術集会（口頭発表）2012年10月13日、久留米

(11) 田上隆一郎、太田啓介、藏田耕作、都合亜記暢、東龍平、金澤知之進、中村桂一郎：FIB/SEM トモグラフィーを用いた脱灰骨および未脱灰骨の微細構造の比較。第68回日本顕微鏡学会学術講演会（ポスター発表）2012年5月14日～16日、筑波

(12) 都合亜記暢、東龍平、太田啓介、中村桂一郎、Cathode Biasを用いた樹脂包埋生物試料表面からのSEM反射電子組成像と染色法。第68回日本顕微鏡学会全国学術集会（ポスター発表）2012年5月14日～16日、筑波

(13) 太田啓介、都合亜記暢、東龍平、田上隆一郎、中村桂一郎：高分解能 FIB/SEM tomography 法によるミトコンドリア膜構造の全解析。第68回日本顕微鏡学会全国学術集会（ポスター発表；優秀ポスター賞受賞）2012年5月14日～16日、筑波

(14) 中村桂一郎、太田啓介、東龍平、林篤正、武谷三恵、鷹野誠、次世代走査型電子顕微鏡 FIB/SEM による平滑筋組織間質細胞の解析第89回日本生理学会大会（シンポジウム）2012年3月30日、松本

(15) 田上隆一郎：ラット皮下異所性新生骨の FIB/SEM トモグラフィーによる微細構造解析。第117回日本解剖学会全国学術集会（ポスター発表）2012年3月26日～28日、甲府

(16) 太田啓介、中村桂一郎：新技法導入による形態学研究の展開。シンポジウム 21. 若手研究の「この一枚」：「超微構造三次元再構築手法による組織・細胞解析」。第117回日本解剖学会全国学術集会（シンポジウム）2012年3月26日～28日、甲府

(17) 中村桂一郎、東龍平、都合亜記暢、力丸由起子、田上隆一郎、金澤知之進、太田啓介：線維芽細胞ネットワーク：BFI 及び

FIB/SEM トモグラフィーによる間葉組織の観察。第117回日本解剖学会全国学術集会（シンポジウム）2012年3月26日～28日、甲府

(18) 太田啓介、中村桂一郎：高解像度 FIB/SEM トモグラフィー法の生物応用、日本顕微鏡学会バイオメディカルニューマイクروسコープ分科会（ポスター発表）平成23年度シンポジウム講演会、東京

(19) Tanoue R、Ohta K、Ogasawara S、Yano H、Kusukawa J、Nakamura K：Lineage analysis of cells involvting in bone formation using the subcutaneous ectopic bone formation model. (poster) abstract pp354、10th Asia-Pacific Microscopy Conference、2012.2.8、West-Australia Parth

(20) Ohta K、Higashi R、Togo A、Rikimaru Y、Tanoue R、Nakamura K：Whole mitochondrial membrane organization of rat hepatocyte revealed by FIB/SEM tomography. (poster) abstract pp242、10th Asia-Pacific Microscopy Conference、2012.2.8、West-Australia Parth

(21) 力丸由起子、太田啓介、田上隆一郎、都合亜記暢、東龍平、中村桂一郎：ヒト肥厚性癬痕およびケロイド組織のメゾスケール形態解析の試み（口頭発表）、第53回日本顕微鏡学会九州支部総会、2011年12月3日、熊本

(22) 太田啓介、力丸由起子、田上隆一郎、都合亜記暢、東龍平、中村桂一郎：FIB/SEM による真皮線維芽細胞の形態とコラーゲン線維の走行（口頭発表）、第53回日本顕微鏡学会九州支部総会、2011年12月3日、熊本

(23) 中村桂一郎、東龍平、都合亜記暢、橋谷光、太田啓介：結合組織除去試料 SEM とブロック表面 FIB/SEM による膀胱上皮下静脈の構造解析。（口頭発表）、第53回日本顕微鏡学会九州支部総会、2011年12月3日、熊本

(24) 太田啓介、都合亜記暢、内田加奈子、田上隆一郎、力丸由起子、東龍平、中村桂一郎：FIB/SEM を用いたミトコンドリアクリステの三次元構造解析。（口頭発表）、日本解剖学会第67回九州支部学術集会、2011年10月22日、宮崎

【その他】
ホームページ等
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/anat2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 桂一郎 (NAKAMURA KEI-ICHIRO)

久留米大学・医学部・教授
研究者番号：20172398

(2) 研究分担者

太田 啓介 (OHTA KEISUKE)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：00258401
東 龍平 (RYUHEI HIGASI)
久留米大学・医学部・その他
研究者番号：70569516
都合 亜記暢 (TOGO AKINOBU)
久留米大学・医学部・その他
研究者番号：80569517

(3) 連携研究者

矢野 博久 (YANO HIROHISA)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：40220206
渡邊 浩 (WATANABE HIRSHI)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：90295080
楠川 仁悟 (KUSUKAWA JINGO)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：30258412
清川 兼輔 (KIYOKAWA KENSUKE)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：10195399
西 昭徳 (NISI AKINORI)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：50228144
牛島 一男 (USHIJIMA KAZUO)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：60136752
山木 宏一 (YAMAKI KOUICHI)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：00166597
奥田 誠也 (OKUDA SEIYA)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：80158823
永田 見生 (NAGATA KENSEI)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：50140687