

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659081

研究課題名(和文) 走査電顕マイクロダイセクション法の確立と生物応用

研究課題名(英文) Biological application of micro-dissection techniques for scanning electron microscopy

研究代表者

牛木 辰男 (Ushiki, Tatsuo)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40184999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ステレオ走査電子顕微鏡(走査電顕)内で自由に遠隔操作できる高性能のマニピュレータを用いて、細胞や組織の立体微細構造をより詳細にできるためのマイクロダイセクション法を開発しその応用を試みた。

その結果、マイクロダイセクションに適した組織の試料作製法を考案し、多様な組織の顕微解剖の可能性を示した。また、針のほかに、マイクロ剪刀やマイクロ鉗子を搭載した2台のマニピュレータを利用することで、より多様なダイセクションが可能になった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we introduced a microdissection technique which can be used in a stereoscopic scanning electron microscope (3D-SEM) and applied this technique to the study on the three-dimensional ultrastructure of cells and tissues.

We developed preparation methods suitable for dissecting samples by the two micro-manipulators in the 3D-SEM. We also used the improved manipulators with a needle, micro-scissors and micro-forceps. Using these micro-manipulators, we succeeded in dissecting some tissue samples(e.g, kidney, inner ear, etc) in a 3D-SEM. Thus, the SEM-dissection technique in a 3D-SEM is very useful for the morphological study on cells and tissues.

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 マイクロ・ナノデバイス マニピュレーション 立体構造 細胞 組織

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

走査型電子顕微鏡(走査電顕)は試料の表面形状を立体的に解析することができることから、細胞や組織の三次元微細構造解析に役立ってきた。しかし、この顕微鏡は表面観察に適している点が長所では一方で、表面下のものは隠されてしまい、観察対象が埋めると見えないという問題があった。これを解決するために、化学的処理により結合組織を除去して観察する手法などが開発されてきたが、内部の構造の観察には、走査電顕観察を行う前に実体顕微鏡下で針などで微解剖する必要があり、これには職人芸ともいべき技が必要であった。また、無理に走査電顕内でコンピュータを使おうとしても単眼視では解剖針と試料の距離もわからず、精巧な解剖は不可能であった。

そこで申請者は、立体視をしながら直接観察できるステレオ(3D)走査電顕の開発に関わり、その中で利用可能な高性能コンピュータの開発を行ってきた。これにより、装置側の問題はかなり解決されたことから、この装置による近未来的な「走査電顕マイクロダイセクション法」の確立に向けた挑戦的な研究を行うことを思い立った。

(2) チャレンジ性としての背景

本申請で提案する「走査電顕マイクロダイセクション法」は、これまでは夢物語と思われていた技術であるが、近年のナノテクノロジーの進展で、現実が可能になりはじめた次世代の技術である。走査電顕内の真空環境でリモート操作ができること、ナノスケールの精度を持ったコンピュータができること、針だけでなくナノレベルの操作が可能な微細なピンセットやハサミが使用できること、立体視をした状態で操作できること、などのハードで克服すべき点の基礎的な開発は済んでいる。そこで、さらに技法を発展・改良するとともに、解剖できる試料処理が行われている点について、さらなる検討をすることで、ミクロのレベル、さらにナノレベルでの細胞、組織の操作が実用的になることが期待される。走査電顕の生物応用の分野は日本のお家芸で、走査電顕開発当初から、装置開発のみならず、細胞・組織の立体構造イメージングでは日本が世界をリードしてきた。その高いレベルで、さらに走査電顕を単なるイメージング(見る世界)の装置からコンピュータ制御(操作する世界)の装置に高める準備が整っている。

2. 研究の目的

肉眼解剖学ではピンセットとメスで解剖しながら人体の構造を学ぶが、この手法をそのまま顕微鏡内で行えるように、ナノテクノロジーを用いたマイクロダイセクションをラットの組織の顕微解剖に応用する。これにより、従来の顕微技法では不可能と考えられた微細な領域での立体解析が可能にし、走査

電顕マイクロダイセクションの新しい分野を創成することを目的とする。具体的には、次の3点について研究を行う。

- (1) 3D 走査電顕内でのマイクロダイセクションのための試料条件の確立
- (2) 3D 走査電顕による組織のマイクロダイセクションの検討

3. 研究の方法

真空中で遠隔操作ができる高性能のマニピュレータを用いて、以下の点を検討した。

- (1) 3D 走査電顕内でのマイクロダイセクションのための試料条件の検討：帯電(チャージアップ)等の軽減と解剖に適した標本処理法を検討する。
- (2) 3D 走査電顕による実際の組織のマイクロダイセクションの検討：器官レベルのマイクロダイセクションについて、ラットの組織を用いて検討する。
- (3) 3D 走査電顕によるマウス胎児のマイクロダイセクションの検討：数ミリ以下の胎児を個体レベルでマイクロダイセクションしていく手法を検討する。

4. 研究成果

- (1) 3D 走査電顕内でのマイクロダイセクションのための試料条件の検討：

走査電顕内でコンピュータ制御を行う場合に問題になるのは、金属コーティングをしなくても観察が可能な導電性を試料が有していること、標本が解剖(ダイセクション)できる柔らかさであること、解剖時に標本が動かないように支持されていること、が必要である。また、実際の解剖に際しては、試料が針、ナノピンセット、ナノハサミなどの適切な道具があることも重要である。この点についてそれぞれ検討を行った。

導電性：タンニン・オスミウム導電染色法を施すことで、高真空の状態でも、コンピュータ制御に支障をきたさず強い帯電はなく、ダイセクションが可能になった。また、帯電に対しては低真空モードを用いることで対応が可能だったが、テレビモードの応答が悪くなる点が問題であった。

試料作製法：通常の試料作製法を行った標本は、マイクロダイセクションを行うには硬すぎた。そこで、KOH 消化法により、試料のコラーゲン成分を除去することで、マイクロダイセクションに適した試料にすることが可能になった。

試料の保持：導電両面テープの上に付着させる方法が有用であるが、保持の方法はケースバイケースであった。

マニピュレータの改良：針のほかにナノピンセットを用いたが、腰が弱く、生物試料のダイセクションには制限があった。そこで眼科学分野の手術に用いられている眼科剪刀と眼科鉗子を利用したマニピュレータを作製したところ、組織のダイセク

ションには有用であった(図1)。

さらに、マニピュレータをより人間の手の動作に近い動きにするために、これまでのxyzの3軸に加え、資料回転、ヨーイングを可能にするものを研究協力者に作製してもらい、その動作確認を行った。これにより、眼科剪刀や眼科鉗子を3D走査電顕内でかなり自由に動かせるようになった(図2)。

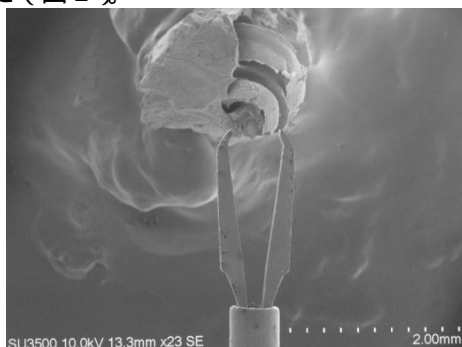


図1 マイクロ鉗子と内耳標本

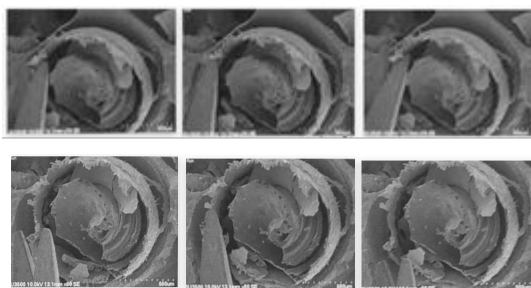


図2 マイクロ剪刀のヨーイング

(2) 3D 走査電顕による実際の組織のマイクロダイセクションの検討

ラットの組織、すなわち腎臓、水晶体、内耳等のダイセクションを行った。とくに眼科剪刀や眼科鉗子を搭載することで、内耳のような複雑な器官の解剖が容易になった(図3、4)。たとえば、硬い骨壁はマイクロ鉗子で少しずつ粉碎して、解剖除去することが可能になり、骨壁に埋もれていた内耳を剖出することが可能となった。また、軟部組織(前庭膜やらせん靭帯など)はマイクロ剪刀を用いて切り取ることができた。さらに、試料回転やヨーイングの動作はきわめて有用で、これにより骨の中に隠れていたコルチ器の有毛細胞を、広範囲に剖出することが可能となった。

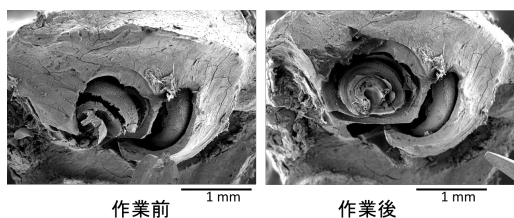


図3 マイクロ鉗子とマイクロ剪刀によるダイセクション(ラット内耳)

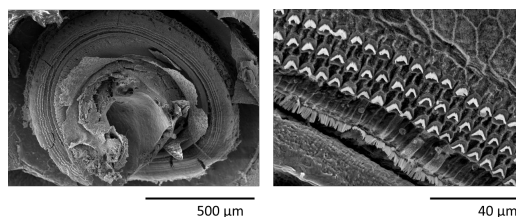


図4 マイクロダイセクションで剖出された有毛細胞(ラット内耳)

(3) 3D 走査電顕によるマウス胎児のマイクロダイセクションの検討

上記の成体組織の検討に時間がかかったため、胎児の標本を用いた検討は、研究機関内に行うことができなかった。

(4) まとめ

本研究では、3D 走査電顕内でマニピュレータを遠隔操作しながら生物試料(組織標本)をダイセクション(顕微解剖)する手法を検討した。試料側については、必要に応じて組織のコラーゲンを選択的に除去することで、ダイセクションに適した試料にすることが可能となった。また、マニピュレータにマイクロ鉗子やマイクロ剪刀を搭載し、人間の手の回内、回外運動を模した可動性を追加することで、より繊細なダイセクションを可能にした。このシステムは、多様な挿し木の立体微細構造解析に理療できることから、今後の普及が期待できる。また、今回は、胎児標本の応用に至らなかったが、精度と実用性については十分可能なところまで本技法を開発・応用することができた。

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 2件)

Iwata F, Y Mizuguchi, H Ko, T Ushiki, A compact nano manipulator based on an atomic force microscope coupling with a scanning electron microscope or an inverted optical microscope. J. Micro-Bio Robot., 査読有, 2013, 25-32 DOI 10.1007/s12213-013-0063-7
岩田 太、牛木辰男、電子顕微鏡におけるAFMのマニピュレータ利用、O plus E, 査読無, 63巻, 2012, 229-234

〔学会発表〕(計 2件)

F. Iwata, D. Koga, T. Ushiki, Manipulation of biological samples in a scanning electron microscope. XXIII International Symposium on Morphological Sciences (招待講演) 2013年9月10~13日, Niigata, Japan
牛木辰男、走査電子顕微鏡による立体組織科学、第113回日本耳鼻咽喉科学会総

会(招待講演) 2012年05月11日、朱
鷺メッセ(新潟市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

走査電子顕微鏡による細胞と組織の立体微
細構造解析

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/an3/research.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

牛木 辰男(USHIKI Tatsuo)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40184999

(2)研究分担者

甲賀 大輔(KOGA Daisuke)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：30467071

(3)研究分担者

中島 真人(NAKAJIMA Masato)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60588250