

【サイエンスカップル】

共焦点レーザー顕微鏡による組織（血管を含む） の三次元的観察法

東京慈恵会医科大学解剖学講座第2

橋 本 尚 詞

私どもでは、組織内の基底膜の分布、神経や血管の走行、細胞の形態などを共焦点レーザー顕微鏡を用いて、立体的に観察するための試料作製法を開発しました。

皆様が通常の組織観察に用いておられる切片の標本では、神経や血管は断片でしか観察できず、組織内の走行や分布を捉えるのは困難ではないかと思えます。また、数多くの切片での観察から三次元的な走行や分布を推測したとしても、それが本当に正しい姿を表しているのかどうか判定することができのでしょうか。

また、組織内に分布する特殊な細胞の形態につきましても、その細胞が豊富に存在していれば、突起の拡がり方などの細胞の形態を捉えることが可能でしょうが、稀にしか存在しない細胞では、その全体像を把握することは難しくないでしょうか。このような場合、組織切片の厚さを厚くして、神経や血管、細胞などの全体像が一枚の切片内に含まれるようにすればよいのかもしれませんが、通常の透過光による観察ではどうしても無理が生じます。共焦点レーザー顕微鏡は蛍光色素で標識した厚い組織切片から連続的に一定の間隔で背景の余分な蛍光を除いた鮮明な光学的断層像を得ることができる装置であり、この連続した断層像からは、CTやMRIの断層像のようにコンピュータを用いて立体像を再構築することが可能です。しかしながら、この目的のためには、対象とするものが可能な限り均質に蛍光色素で標識されている必要があります。また、落斜蛍光顕微鏡と同様の光路ですので、試料の光透過性が良くなければなりません。私どもでは、どのような固定法、前処置法、染色法、封入法を行えば、これらの点を改善することができ、組織内の構造物を三次元的に観察で

きるかを検討し、満足のいく結果が得られる技法を開発しました。（図1,2参照）

この方法は、組織を固定するところから始まりますので、ホルマリン固定されてパラフィンに包埋されているブロックには応用できませんが、これから新たに手術材料や剖検材料、動物実験を対象とする場合には、応用可能です。

条 件

私どもでは、試料作製法や観察法の説明、試料作製に必要な設備の提供はできますが、試料をお預かりして作製することは人的資源の面より不可能です。また、観察に用いる共焦点レーザー顕微鏡は各自で手配していただく必要があります。

文 献

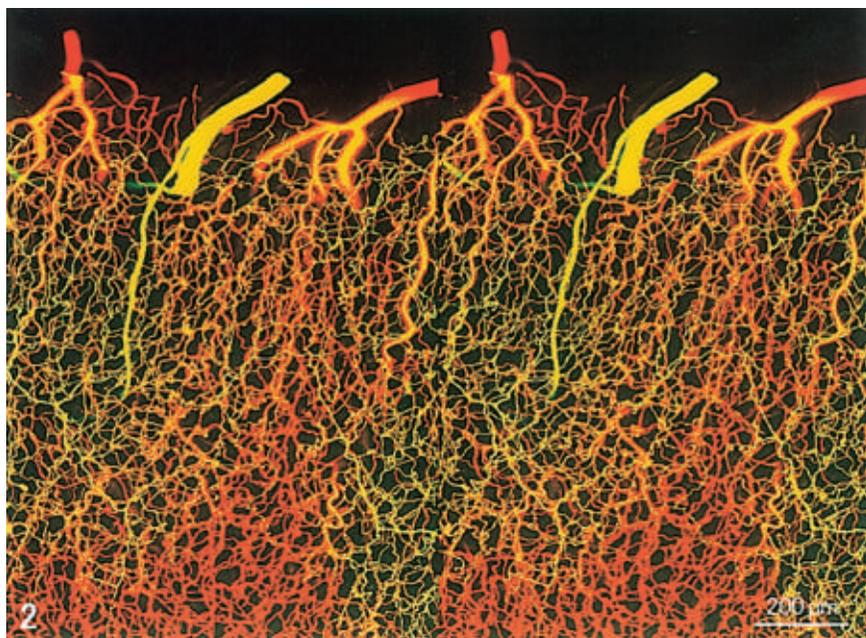
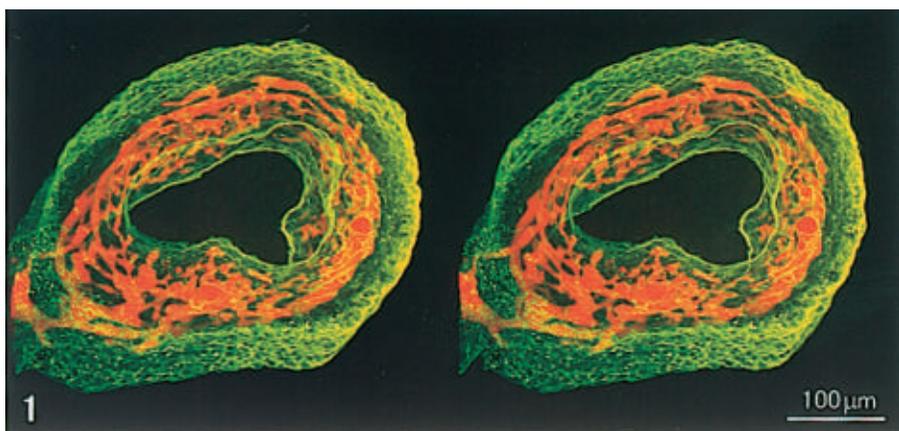
Hashimoto H, Ishikawa H, Kusakabe M. Preparation of whole mounts and thick sections for confocal microscopy. *Methods Enzymol* 1999; 307: 84-107.

連絡先

tel: 03-3433-1111 (内線2206)

fax: 03-3433-2065 (直通)

e-mail: hashimoto.anat@jikei.ac.jp



図について

この方法によって得られた三次元像の例

図1,2は立体像とするためにステレオペア写真になっています。ステレオペア写真は、右側の図を右眼で、左側の図を左眼で見ることによって立体感が得られます(これを平行法といい、もう1つ交叉法というのがあります、この方法では右眼で左側の図、左眼で右側の図を見ます)。最初は見難いかもかもしれませんが、図を目の前に近づけて、図の上

につけてある黒丸を右眼で右の黒丸、左眼で左の黒丸を注視します。ついで、黒丸を注視しながら眼の焦点を遠方にずらしていくと(意識して遠いところを見るようにする)、左右の黒丸がそれぞれ2つに分かれ、全部で4つの黒丸が見えてきます。さらに注視を続けると、4つの黒丸の中側の2つが近寄り、それが1つに重なって、黒丸が3つになります。この状態で下の図に視線を移すと、同じような図が3つ見え、中央の図では立体感をもって観察することができます。

図1. 妊娠14日目のマウス胎仔小腸の血管網と基底膜

妊娠14日目のマウス胎仔を生かした状態で臍静脈から蛍光色素で標識したゼラチンを還流し、固定後、小腸を摘出して100 μm の厚切り切片を作製し、ラミニンを蛍光抗体法で染色した。共焦点レーザー顕微鏡で1.95 μm ごとに52枚の連続光学断層像を取り込み、三次元再構築を行ってステレオペア写真とした。

ラミニンによって基底膜が染色されるため、上皮と間葉組織の境界を明瞭に観察することができる。妊娠14日目はちょうど小腸で絨毛の形成が始まる時期であり、絨毛の形成と血管網の分布の関連性を明確に捉えることが可能である。

図2. 成獣マウス的大脑皮質の血管網

成獣マウスの上半身を左心室から蛍光色素で標識したゼラチンで還流し、還流終了直前に異なる色の蛍光色素で標識したゼラチンを少量注入した。固定後、脳を摘出して300 μm の厚切り切片を作製した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて5 μm ごとに60枚の連続光学断層像を取り込んだ。この図は、60枚の連続光学断層像のうち、表面から11枚目より40枚目までの30枚の断層像を用いて三次元再構築を行い、ステレオペア写真とした。最初に赤い蛍光色素で還流し、最後に緑の蛍光色素を注入しているため、動脈系は緑色から黄色で、静脈系は黄色から赤色で示されている。大脑皮質では表層を動静脈が走行しており、動脈から分岐した枝が大脑皮質の深部に向かってほぼ垂直に下り、さまざまな高さで分岐した枝が毛細血管網を構築した後、大脑皮質の深部から表層に向かってほぼ垂直に上昇する静脈に集まるのを観察することができる。