

令和元年9月3日
国立大学法人浜松医科大学

NanoSuit Technology を利用したパラフィン切片の 非破壊的な光-電子相関顕微鏡法 (CLEM) 観察法の開発

<概要>

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・ナノスーツ開発研究部の河崎准教授と針山特任教授らは NanoSuit Technology を利用したパラフィン切片の非破壊的な光-電子相関顕微鏡法 (CLEM: correlative light and electron microscopy) 観察法の開発に成功しました。この成果は、米国・カナダ病理学会(USCAP)の学術雑誌「Laboratory Investigation」に掲載されました(日本時間 8 月 30 日から、online 版で公開されました)。

<研究の背景>

真空を必要とする電子顕微鏡では、80%ほどの水分を含む生物試料の形状を維持させながら固定・脱水するという長い時間の工程が必要でした。NanoSuit 法を用いると、生物適合性高分子溶液(NanoSuit 溶液)を使用して、試料周辺にナノ薄膜を短時間の内に形成させ、濡れたままの試料を、そのままの形状で観察することができます。今回は、この NanoSuit 法を主に病理検査で扱っているパラフィン切片に応用しました。病理診断では、光学顕微鏡を用いて熟練した病理医が目すべき部位を特定するのですが、より高倍・高解像度で観察する必要が生じることがあります。その際、電子顕微鏡が用いられますが、光学顕微鏡で観察した同じ箇所を電子顕微鏡で観察するには数々の障壁があり、世界的にこの問題解決のための研究がなされていました。たとえば、電子顕微鏡と光学顕微鏡という異なる種類の顕微鏡を用いる際に生じる位置合わせの問題を解決するために、CLEM 専用機器の開発がなされています。しかし専用機器は高価であり、かつ専用試料を準備する必要があります。本報告の新しい方法により光学顕微鏡で注目すべき部位であると病理医が判断した全く同じ箇所を、すでに市販されている走査型電子顕微鏡(SEM: scanning electron microscope)を用いて、現存の病理標本を高倍・高解像度かつ立体的な観察像を容易に得ることに成功しました。今後は、本法が広く世界で利用され、既存の光学・電子顕微鏡を用いて容易に様々な診断や研究に応用されることとなります。

<研究の成果>

病理診断では光学顕微鏡で同定した部位をより高倍で観察する必要が生じることがあり、そのためには電子顕微鏡は不可欠です。組織切片標本の重要な病変箇所を光学顕微鏡で特定し、カバーガラスを外し NanoSuit 溶液塗布後に、特定した部位の周辺を別途 NanoSuit 溶液でマーキングすることで SEM に移動しても容易に同一箇所を見つけることができ、そのまま観察することを可能にしました。また、NanoSuit 薄膜は絶縁体であるガラス上にある組織切片に導電性を付与するためチャージ(帯電現象)軽減効果があり、よりクリアで高分解能な SEM 画像を得ることを助けます。SEM 観察後でも再染色により標本をもとの状態に戻すことができ、NanoSuit 溶液によるマーキングも除去できます。その作業過程において同一切片を非破壊的に扱うことができ、可逆的に切片をもとの状態に戻すことができるため貴重な切片を失わないという利点が生まれました。今回の論文では SEM による含水状態の組織微細構造(真菌、原虫、細菌、ウイルス、細胞突起、筋組織構築、血管内皮表面、腎臓微細構造など)の観察結果や、塩化金染色を加えることで従来難しか

った SEM での細胞核の同定や免疫染色によるジアミノベンチジン (DAB) 染色部位の観察も可能であることを報告しました。さらに抗体-金粒子を利用することでパラフィン組織切片のタンパク定量の可能性や、金属蒸着や炭素蒸着以外の方法である NanoSuit 法を用いた新たな元素分析の高い有効性を示すことができました。

<今後の展開>

NanoSuit Technology を利用したパラフィン切片の非破壊的な光-電子相関顕微鏡法 (CLEM) 観察法は下記の表に示したように様々な応用が想定されます。今後は、これまで 100 年以上の歴史のある光学顕微鏡を用いた診断情報に、立体的な高分解能の情報や元素分析情報が加わることにより、たくさんの新たな発見が加わることが予想されます。NanoSuit 法による CLEM 観察が広がることにより新しい知見が生まれ、新たな病理診断法や生物試料観察法として展開される可能性があります。

想定される用途と可能性

NanoSuit法によってパラフィン切片観察で可能になったこと

● 光学顕微鏡とSEMで同一部位を簡単に観察
● SEM観察後でもH&E標本をもとの状態に復元
● 病原体などをSEMで高倍率観察
● 含水組織の微細構造を観察
● SEM観察における細胞核の同定
● DAB染色部位のSEM観察での特定
● SEMによるタンパク発現量の定量
● パラフィン組織切片の元素分析

<発表雑誌>

Laboratory Investigation:

Laboratory Investigation は 1952 年に創刊された米国・カナダ病理学会(USCAP)の学術雑誌で、Nature Publishing Group によって発行されている査読付き医学雑誌です。

<論文タイトル>

The NanoSuit method: a novel histological approach for examining paraffin sections in a nondestructive manner by correlative light and electron microscopy

<https://doi.org/10.1038/s41374-019-0309-7> (doi: 10.1038/s41374-019-0309-7)

<著者> (*研究責任者)

Hideya Kawasaki*, Toshiya Itoh, Yasuharu Takaku, Isao Kosugi, Shiori Meguro, Toshihide Iwashita, Takahiko Hariyama*

(河崎 秀陽*、伊藤 敏谷、高久 康春、小杉 伊三夫、目黒 史織、岩下 寿秀、針山孝彦*)

<研究グループ>

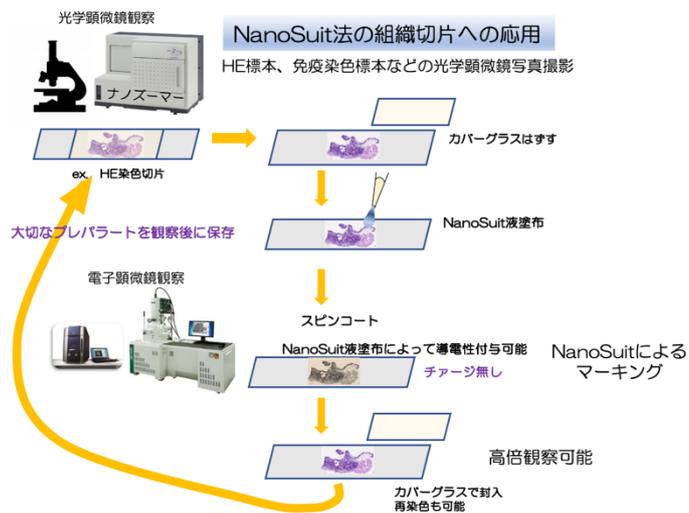
本研究は浜松医科大学ナノスーツ開発研究部、再生・感染病理学講座、産婦人科講座の共同研究で、JST START 事業、日本学術振興会からの研究費を受けてまとめられた結果です。

<本件に関するお問い合わせ先>

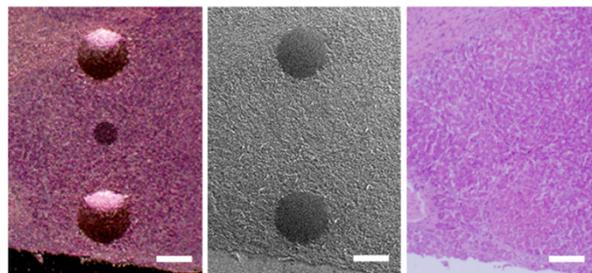
国立大学法人浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・ナノスーツ開発研究部
 〒431-3192 浜松市東区半田山 1-20-1
 部長 准教授 河崎秀陽、特任教授 針山孝彦
 Tel: 053-435-2504 / Fax: 053-435-2504
 E-mail: gloria@hama-med.ac.jp or hariyama@hama-med.ac.jp

<参考図>

組織標本観察手順
 (光学顕微鏡と電子顕微鏡の併用:
 観察後に再保存も可能)



NanoSuit液を用いたマーキング

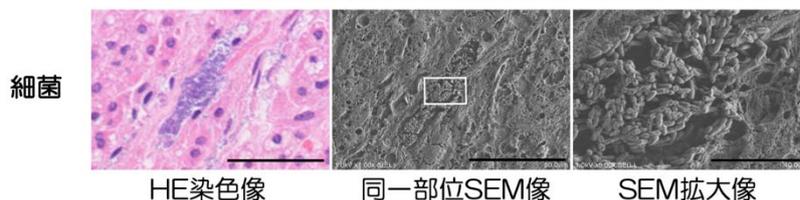


光学顕
 微鏡像

電子顕
 微鏡像

H&E
 再染色像
 (マーキング
 消去可能)

CLEM-NanoSuit法による病原体観察



HE染色像

同一部位SEM像

SEM拡大像