

最終講義

生体微細構造における物質分布の映像化 ーイオン顕微鏡の医学・生物学への展開ー

高屋 憲一

富山医科薬科大学医学部解剖学 2

1. はじめに

私の専門は、顕微鏡を用いて観察した生体の微細構造を機能と関連づけて解釈することです。特に光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察する切片標本の作製方法の改良に力を注いできました。さらに生体の細胞や組織中の元素、原子あるいは分子の分布を映像で見るマイクロビームアナリシスにも取り組んできました。

2. 生体の微細構造を見る

a. 顕微鏡の種類

生体の微細構造を調べるには、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡および電子顕微鏡が用いられます。それぞれビームとして、可視光線、紫外線、電子線を用います。私が主に用いてきた透過型電子顕微鏡では電子線をビームに用いており細胞の微細構造まで見るができます。

b. マイクロビームアナリシス

さらに生体の細胞や組織中の元素、原子あるいは分子の分布を見るマイクロビームアナリシスにはX線マイクロアナライザーや電子分光顕微鏡、イオン顕微鏡が用いられます。私が最も重点的に取り組んできたイオン顕微鏡では、イオンをビームとして用い、検出された二次イオンの質量を情報源として得たイオン像により細胞や組織中の元素、原子、分子の分布を見ることができます。

3. より生体に近い状態の試料を観察する

a. パラフィン切片

この大学に来て最初に携わったのは、組織学実習で用いるパラフィン切片の染色標本作製でした。実習室で、できたての染色標本を配った事もありました。約2年間かけて揃えた100枚以上の標本は、その後も新しいものを加えたりさし変えたりして充実を計ってきました。図1はサル網膜のパラフィン切片、ヘマトキシリン・エオジン染色標本です。

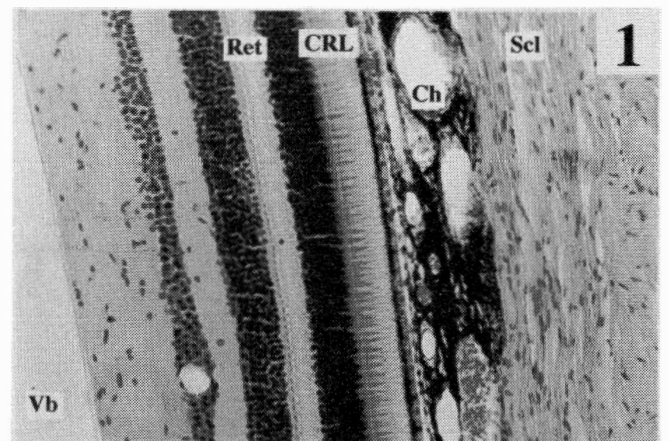


図1. サル網膜のパラフィン切片、ヘマトキシリン・エオジン染色標本。Ret: 網膜, CRL: 杆状体・錐状体層, Ch: 脈絡膜, Scl: 強膜, Vb: 硝子体。

b. 新鮮凍結乾燥超薄切片

私は約30年の間、新鮮凍結乾燥超薄切片の作製に専念してきました。従来の方法では試料中の可溶性物質が流失あるいは移動するのに対し、新鮮凍結乾燥超薄

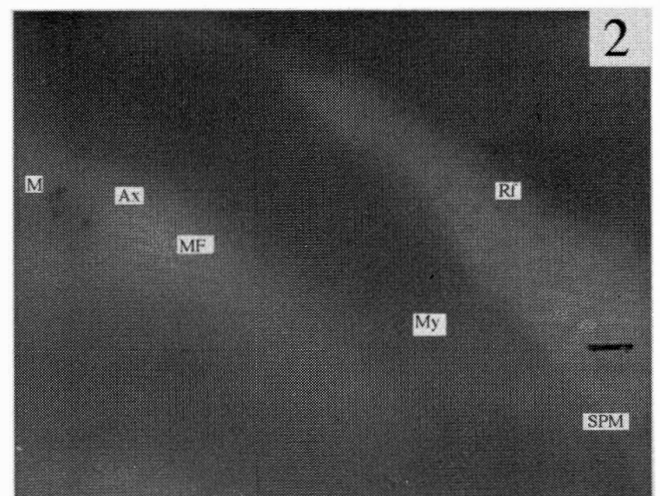


図2. ラット坐骨神経の新鮮凍結乾燥超薄切片の透過型電子顕微鏡写真。My: 髄鞘, Ax: 軸索, M: ミトコンドリア, SPM: シュワン細胞の細胞膜, Rf: 細網繊維, MF: フィラメント。bar=1 μ m

切片では生体内の物質を保持して観察することができます。このため生体微細構造の正確な情報を得るために非常に適しているといえます。

図2はラット坐骨神経の新鮮凍結乾燥超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察したものです。末梢神経の髄鞘を持ったシュワン細胞の微細構造を示します。

図3は尿道球腺の新鮮凍結乾燥超薄切片の透過電子顕微鏡像です。粘液細胞からなっている細胞の顆粒が見えています。この中にはプロテオグリカンあるいはグリコプロテンが含まれています。ふたつの粘液顆粒(MG)の間に2枚の単位膜が重なっています。

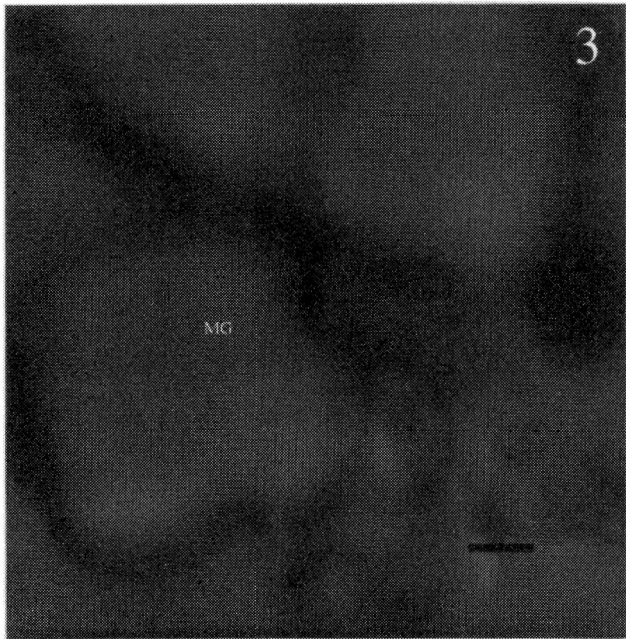


図3. ラット尿道球腺の新鮮凍結乾燥超薄切片の透過電子顕微鏡写真。MG: 粘液顆粒。bar=50nm

4. 細胞や組織における元素・分子の分布を見る

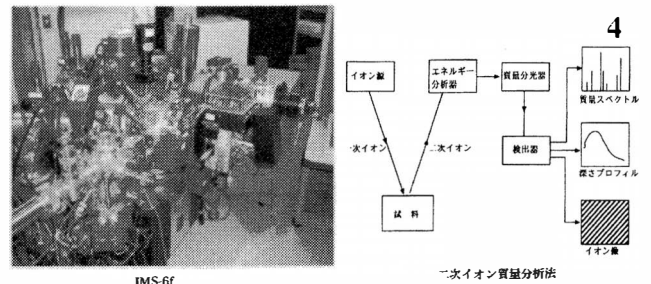
a. イオン顕微鏡：二次イオン質量分析計(IMS-6f)

二次イオン質量分析計（IMS-6f, フランスカメラ社製）で得られた二次イオン像からは試料における元素、原子、分子の分布を映像で見ることができます。図4にIMS-6fとその原理を示します。私たちは主に走査イオン像を観察します。

b. 生体を構成する元素

生体は物質から成り立っていますが、その物質が何からできているかについて紀元前から現在にいたる学説を図5にまとめました。De rerum naturaとは「物の本質について」という意味です。

生体に存在する元素には存在量が多い酸素、炭素、水素、窒素に加え、主に電解質となるのがカルシウム、リン、カリウム、硫黄、ナトリウム、塩素、マグネシウムがあります（図6）。この他にシリコン、ストロ



一次イオン源	検出可能なイオン	走査二次イオン像分解能	加速電圧	強度
O ₂ ⁺	陽イオン	0.2 μm	15 keV	E-9~11A
Cs ⁺	陰イオン	0.2 μm	10 keV	E-10~12A
Ga ⁺	陽イオン 陰イオン	55 nm	30 keV	1~2 μA

IMS-6fにおけるイオン源に対する検出可能なイオンの種類および二次イオン像の分解能

図 4. IMS-6f とその原理。CL 1 : 一次イオンカラム, CL 2 : 二次イオンカラム。Ga⁺を一次イオンビームに用いると、陽イオンと陰イオン両方の元素を検出することができ、ビームの径を非常に細く絞ることができます。

A) 物質とは何か 紀元前からの解明

Leukippos (前5世紀)	原子と空虚 (真空)
Democritus (前460~前370)	原子 形と大きさが異なる
Epicurus (前342~前271)	重量、質量が異なる
Lucretius (前97~前55)	
De Rerum Natura (物の本質について)	上記すべてを詠った詩を残した

B) 物質とは何か 現在の学説

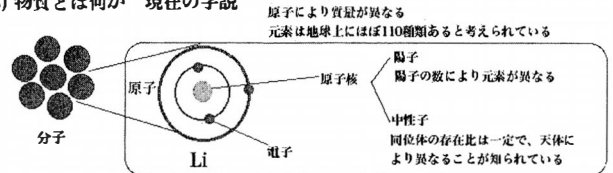


図5. 物質とは何か。紀元前から現在にいたる学説。

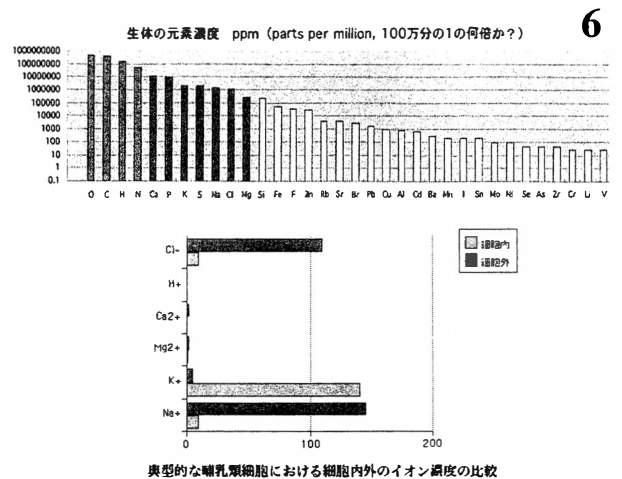


図 6. A: 生体に存在する元素、B: 典型的なほ乳類における細胞内外のイオン濃度差の比較。

ンチウム、アルミニウムの様に生体中にかなりの量が存在しますが、ほとんど働きのわかっていない元素やAs、PbやCdのように毒性が知られているものもあります。こうした元素の細胞や組織における分布を明らか

にする事は、その働きを解明する手がかりとなると考えられます。こうした知見が、病気の予防や治療へ活用される事が期待されます。

こうした生体の元素や分子は水の中に溶けている可溶性ものと、溶けないで分子内に結合しているものとがあります。生体の4分の3は水ですが、その中に存在する可溶性物質でも細胞の内外で分布が明瞭に異なります(図6)。特にカリウムは細胞内に多く、ナトリウムは細胞外に多い事が知られています。

c. 観察された元素分布を微細構造と関連づける

イオン顕微鏡を用いて得られた二次イオン像は、特定の元素や分子の分布が濃淡によって二次元的に示されたものです。このため、細胞や組織における元素や分子の分布を正確に知るためには透過型電子顕微鏡で観察された微細構造と照らし合わせる必要があり、同一試料を透過型電子顕微鏡とイオン顕微鏡の両方で観察します。これに適した試料を得るため改良したのが、新鮮凍結超薄切片をコロジオンの膜をはったグリッド上において凍結乾燥するという方法です。新鮮凍結切片の作製と観察法を図7にまとめました。

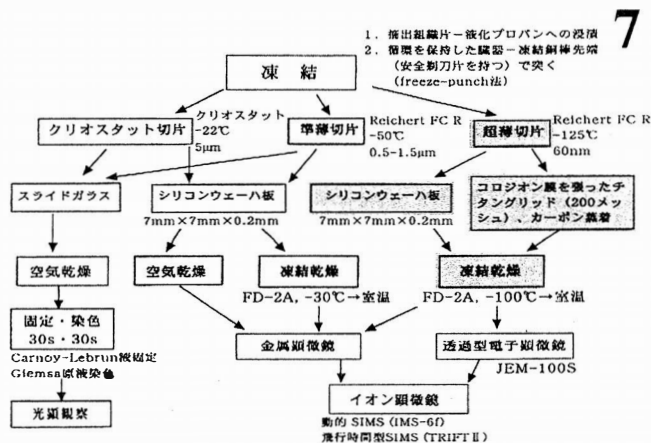


図7. 新鮮凍結切片の作製と観察法

d. 新鮮凍結乾燥超薄切片のイオン顕微鏡観察

図8はアフリカツメガエルの脾臓の新鮮凍結乾燥超薄切片をチタングリッドのコロジオン膜上で透過電子顕微鏡で観察した結果です。いくらか細胞内がこわれていますが、顆粒が見られる部位とほとんど見られない部位があります。同一試料をイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像を図9に示します。細胞全体にナトリウム、カリウムの分布が見られます。マグネシウムは顆粒の多くあるところに出ています。核にはカルシウムが少なくなることが知られていますが、カルシウムが出ていない所が核に相当すると思われます。

細胞内にはカリウムが多く、細胞外にはナトリウムが多いことは図6で説明しました。図10は血液のbuff

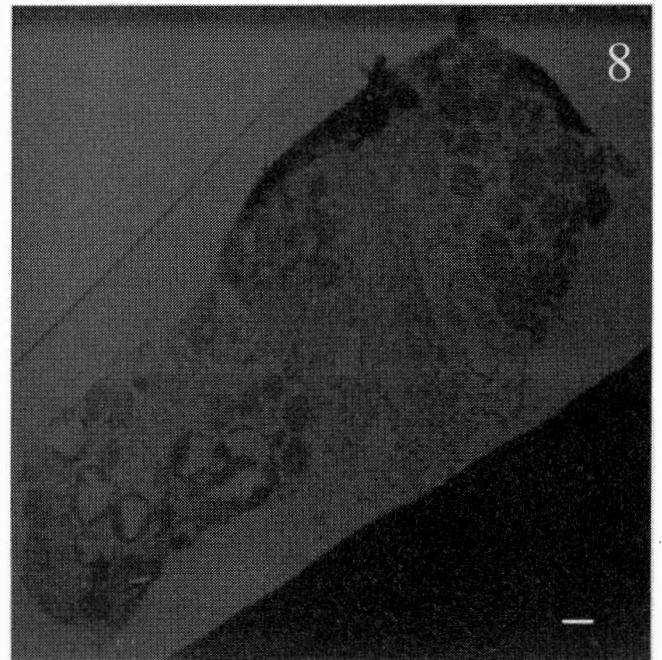


図8. アフリカツメガエルの脾臓の新鮮凍結乾燥超薄切片をチタングリッドのコロジオン膜上で透過電子顕微鏡で観察した透過電子顕微鏡写真。

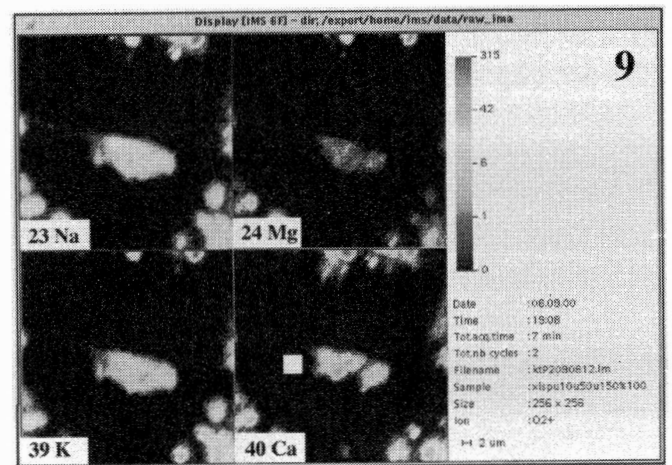


図9. 図8と同一試料をイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像。bar=1 μm

y coatをイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像です。buffy coatとは血液を試験管に取りヘパリンを加えて遠心分離すると赤血球の上に生じる層です。細胞内にカリウムが多く、外にナトリウムが多いことがわかります。また、細胞内にマグネシウムが、細胞外にカルシウムが多く見られます。カルシウムは細胞内には非常に少ないこともわかりました。

図11はラットの坐骨神経の新鮮凍結乾燥超薄切片をイオン顕微鏡で観察した結果です。髄鞘と軸索が見えます。ナトリウムが軸索に多いことがわかります。マグネシウムは軸索のところに高濃度に出ています。カ

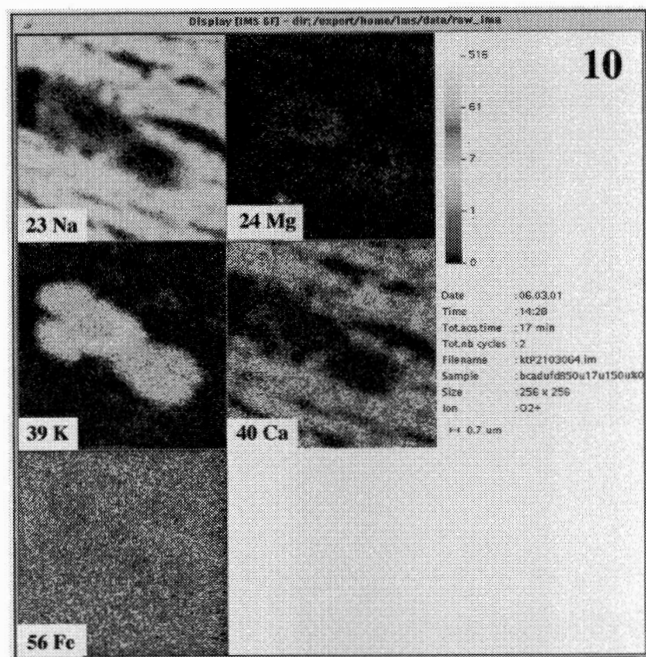


図10. 血液のbuffy coatをイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像。

リウムは軸索にも髄鞘にもよく出ていますが、特に髄鞘のほうに出ています。カルシウムも髄鞘に高濃度に出ています。カルシウムの表示が非常に強く出ているのはミトコンドリアの中にリン酸カルシウムが蓄積しているためと考えられます。

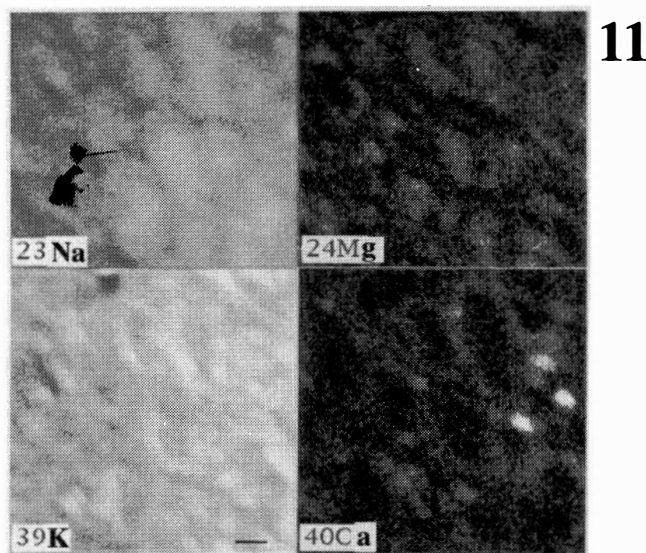


図11. ラット坐骨神経の新鮮凍結乾燥超薄切片をイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像。bar=10 μm

図12はリチウムを投与したラットの肝臓をイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像です。リチウムを投与したラットの肝臓ではナトリウムが肝細胞の中にみられます。カルシウムは、ところどころ無いところが

あり、核に相当します。注目していただきたいのはこのリチウムの像です。リチウムの分布をよく見ますと核のところも、細胞質のところも同じように分布している事がわかります。

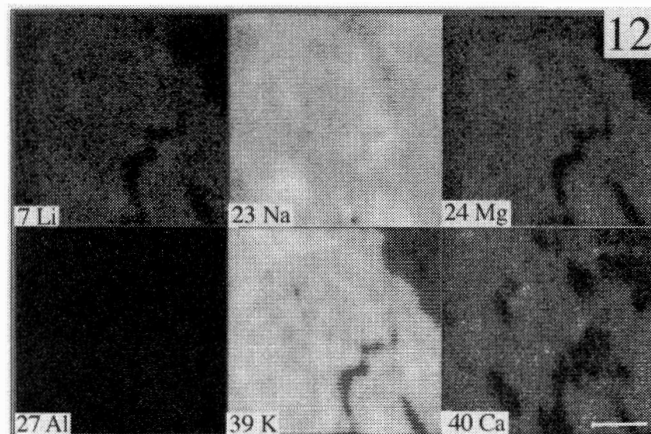


図12. リチウムを投与したラットの肝臓をイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像。bar=10 μm

e. クリオスタット切片が広範囲に渡る観察を可能にし、組織レベルでの元素分布を見る事ができるようになった

新鮮凍結乾燥超薄切片の場合一次イオンを照射後すぐに二次イオンが発生しますが、非常に狭い範囲しか観察することができません。より広範囲の組織レベルでの分布を見るためにはクリオスタット切片が適しています。

図13はオオイトサンショウウオの肝臓をイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像です。アルミニウムと鉄を持った細胞があります。必ずしも両方持っているとは限りません。いくつかの細胞に鉄が、いくつかには少ない数ですがアルミニウムが見られます。

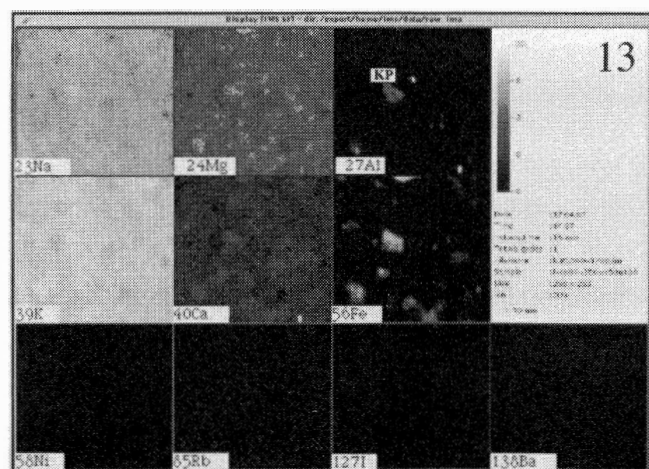


図13. オオイトサンショウウオ肝臓をイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像。KP: Kupffer細胞

f. 生体試料の観察に適した「長時間低出力照射法」の開発

クリオスタット切片を用いた場合、切片に厚みがあるため二次イオンを検出するためには強い一次イオンビームを短時間照射するか、弱いビームを長時間照射する必要があります。強いビームを照射すると試料を損傷してしまいますが、弱いビームでは試料を傷める事無く二次イオンを検出する事ができます。

図14はマウス脊髄後根神経節のクリオスタット切片を長時間低出力照射法によりイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像です。切片が非常に厚いため一次イオンの照射を始めても二次イオンがすぐには発生しません。6000秒、ほぼ二時間一次イオンビームをあてますと、やっと二次イオンビームが出てきてそれが最高に達するのがだいたい二時間半後ぐらいです。この平行になった時点で分析を始めることができます。

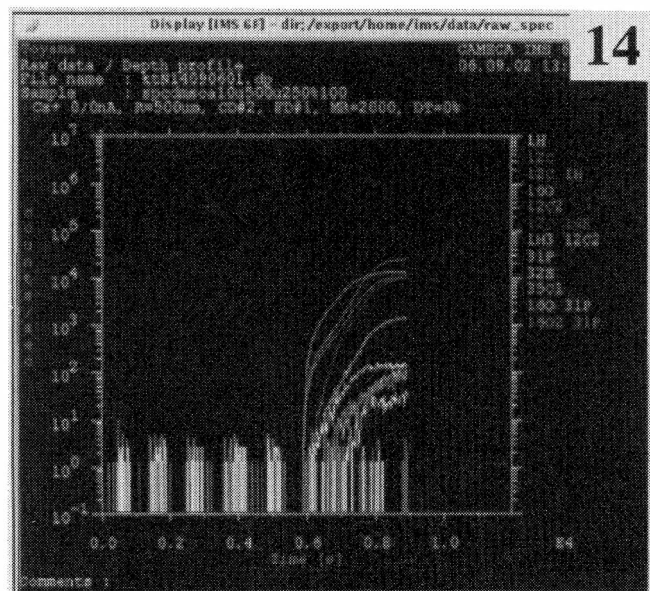


図14. マウス脊髄後根神経節のクリオスタット切片を長時間低出力照射法によりイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像。

図15は脊髄前角のクリオスタット切片をイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像です。一次イオン源に O_2^+ を用い陰イオンを見えています。 PO_2 が神経細胞(NC)に見られます。神経細胞のまわりに有機物CHが見られます。有機物がでるところにはOやClがあまり出ていませんが、CNはでています。

図16は人の軟骨を顕微鏡で観察したもの電子顕微鏡写真の模式図です。軟骨細胞の間の間質にたくさんの膠原繊維があり、その間を線維と細胞基質が埋めています。図17はキンギョ眼球的軟骨をイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像です。軟骨全体にナトリウム

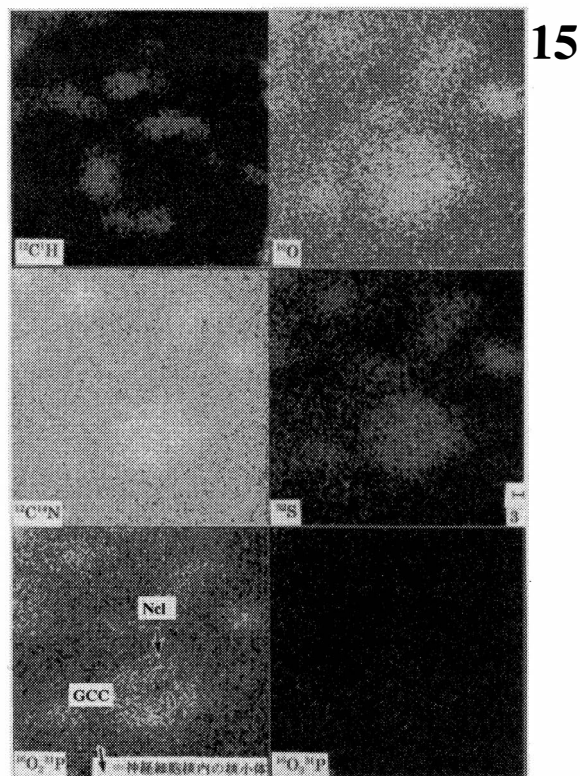


図15. マウス脊髄前角のクリオスタット切片をイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像。GC: 神経細胞、GCC: 神経細胞の細胞質、Ncl: 核小体。bar=3 μ m

とカリウムがみられます。さらに銅、バリウム、マグネシウムがあります。カルシウムが細胞外に検出されています。軟骨基質にはほとんどカルシウムがないことがわかりますが、矢印の基質のところにカルシウムがよく出ています。もうひとつ注目していただきたいのは軟骨基質、細胞外間質に高濃度のカリウムが存在することです。この結果は先ほどの細胞の中にカリウム、外にナトリウムということに矛盾しています。



ガラス軟骨（間質は線維と基質、プロテオグリカンと糖蛋白からなる）。

図16. ヒト軟骨を電子顕微鏡で観察した電子顕微鏡写真と模式図。Chc: 軟骨細胞、ChMx: 間質、Clf: 膠原繊維、GS: 基質。ChM: 軟骨膜。

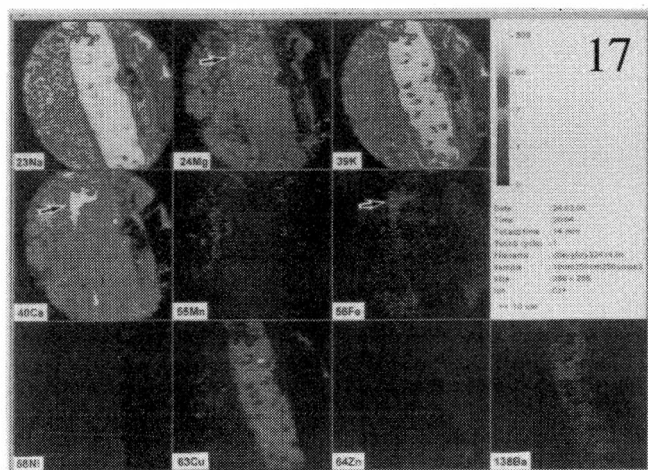


図17. キンギョ眼球の軟骨をイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像。矢印は軟骨基質のCaとFeが高濃度に存在する部位。

g. イオン顕微鏡を用いて元素同位体を区別して映像化した結果、組織内分布がほぼ同じであった

図18はオオイトササンショウウオの舌の軟骨のCCDカメラで観察した写真とイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像です。軟骨基質にはカリウム、マグネシウムやカルシウムが多くナトリウムも見られます。さらに質量39のカリウムと質量41のカリウムが同様に分布しています。

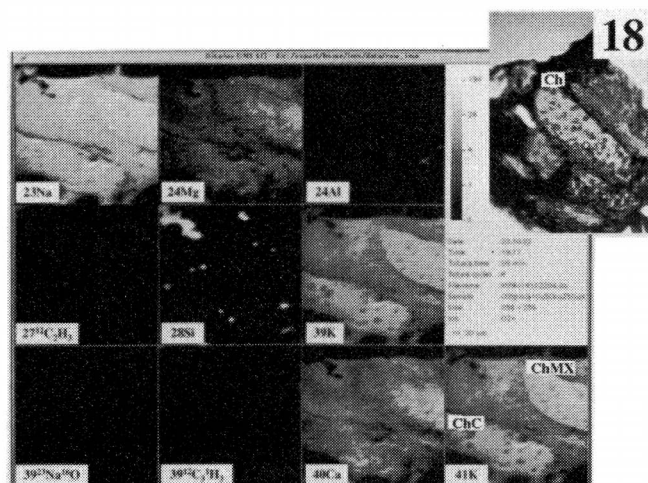


図18. オオイトササンショウウオの舌軟骨のCCDカメラ像とイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像です。Ch: 軟骨、Chc: 軟骨細胞、ChMx: 基質。

h. 「高質量分解能分析法」により、有機物と金属のイオンを区別できる

有機物と金属イオンでは非常に近似した質量を持ったものがあります。質量分解能を高めると、両者を区別する事ができます。

図19はアマガエルの眼球軟骨を高質量分解能分析法で分析した結果をスペクトルで示したものです。三つ

ピークがありますが、カリウム39とNaOを区別するためには1800の分解能が必要になります。 C_3H_3 と区別するためには670の分解能が必要で、きれいにいくつかのピークにわかれています。

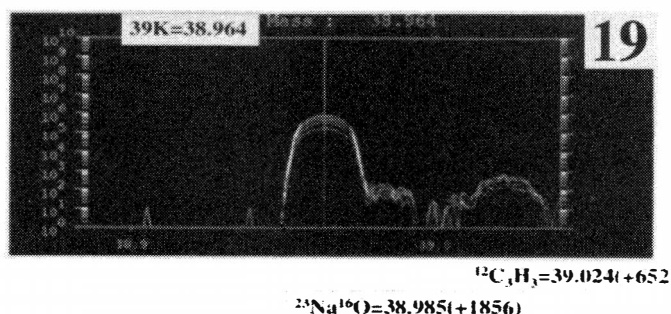


図19. アマガエルの眼球軟骨をイオン顕微鏡を用いて高質量分解能分析法で分析した結果得たスペクトルです。

イオン像の分解能は標準試料を用いて確めました。標準試料とは、イオン像の調節に用いられるアルミニウムの上に銅グリッドをおいたものです。 Al と C_2H_3 のピークがきれいにありますが、これらを分けるには647の分解能が必要です。リチウムを投与したラットの卵巣を分析しますとアルミニウムと C_2H_3 を区別できます。

i. 生体試料の微細構造を三次元的に観察する「3D照射法」の開発

同一部位に長時間の照射を続けると、検出されるイオンが推移することがわかりました。これは、照射した一次イオンにより試料がスパッターされた（掘り進められた）ためと考えられます。これを利用し、時間経過ごとの観察結果を総合的に見る事で、生体試料の微細構造を三次元的に捕らえることができると考えられます。

図20は雨がえる眼球網膜のクリオスタット切片をCarnoy-Lebrun固定、Giemsa染色し光学顕微鏡で観察した結果です。網膜が10層に分かれているのが見られます。図21は同一試料を金属顕微鏡で観察した結果です。図22は同一試料をイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像です。杆体錐体層に C_2H_3 が非常に強く出ています。 C_3H_3 のような炭化水素イオンがでていいる所にはマグネシウムやカリウム、カルシウムはほとんど

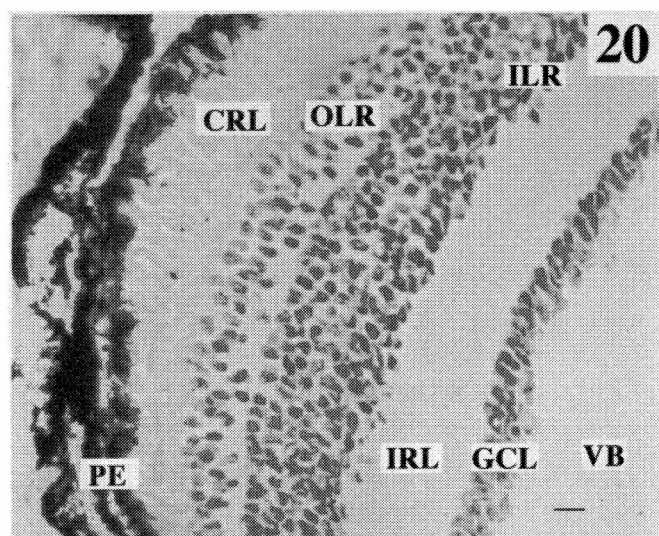


図20. 雨かえる眼球網膜のクリオスタット切片をCarnoy-Lebrun固定、Giemsa染色し、光学顕微鏡で観察した結果。VB: 硝子体, PE: 色素上皮細胞層, OLR: 網膜の外層, ILR: 網膜内層, IRL: 内網状層, GCL: 神経細胞, CRL: 杆状体・錐状体層。bar=10 μ m

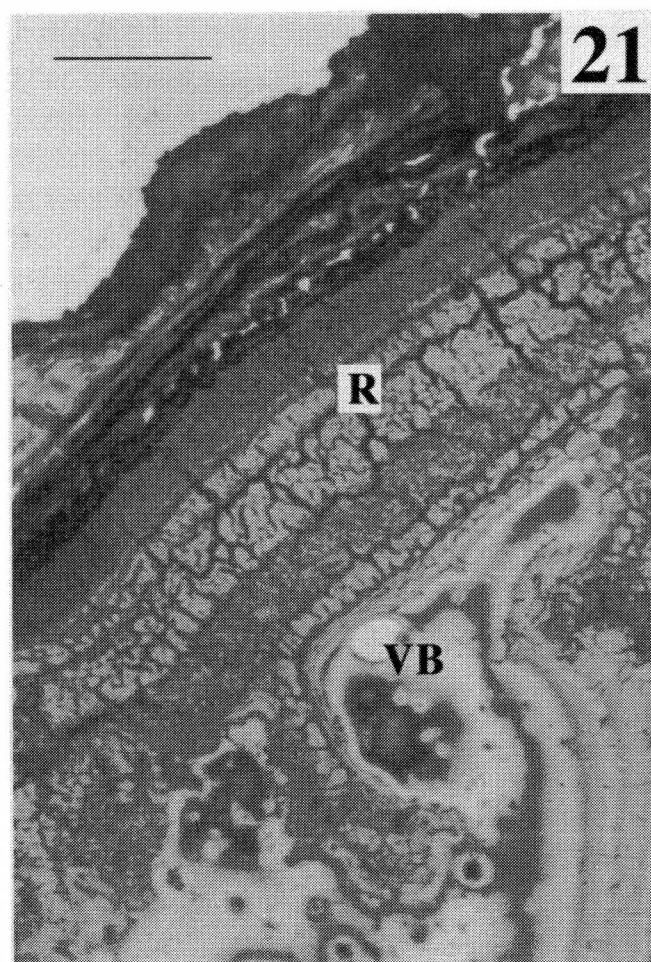


図21. は図22と同一標本を金属顕微鏡で観察した結果です。R網膜, VB硝子体。bar=100 μ m

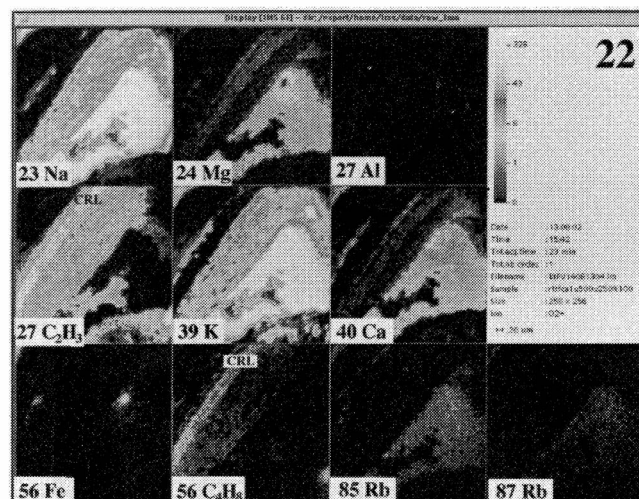


図22. は図21と同一標本をイオン顕微鏡で観察した結果です。CRL: 杆状体・錐状体層

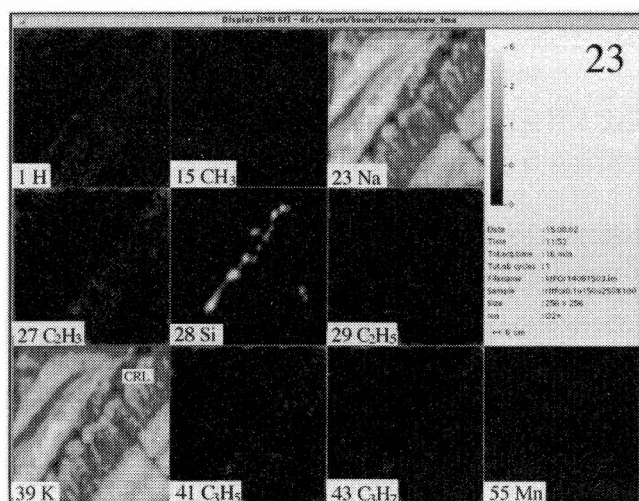


図23. はさらに照射部位を小さくしてイオン像を拡大して照射をした結果。CRL: 杆状体・錐状体層

出ません。拡大すると硝子体にナトリウムやカリウムは出ていますが、マグネシウムやカルシウムはほとんど出ていません。さらに照射部位を絞りイオン像を拡大して照射を続けてゆくと、徐々にナトリウムが出てきます。検出される有機物イオンの量は減少しナトリウムやカリウムが強く出てきます(図23)。

図24はリチウムを投与したラット卵巣の卵胞をイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像です。はじめは有機物のみ検出されていましたが、長時間照射することで徐々に金属イオンが観察される様になりました。アルミニウムは外にはほとんど見られませんが、カルシウムが卵胞の壁の中にあります。リチウムが集まっている所もあります。

j. 飛行時間型二次イオン質量分析計 (TOF-SIMS) を用いると有機物イオンの分布を見る事ができる
飛行時間型二次イオン質量分析計 (TOF-SIMS)

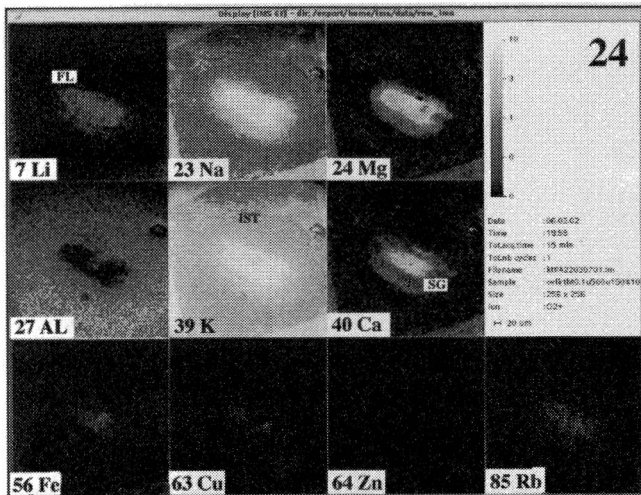


図24. リチウムを投与したラット卵巣の卵胞をイオン顕微鏡で観察した走査二次イオン像。

は検出された二次イオンの質量差が飛行時間に比例することを利用しており、有機物イオンの細胞や組織における分布を映像で見ることが出来ます。

図25ラット腎臓周辺の脂肪組織のクリオスタット切片をTOF-SIMSで観察した結果です。全イオンで像を観察しますと組織像を非常にきれいに得ることが出来ます。注目していただきたいのは279のリノール酸

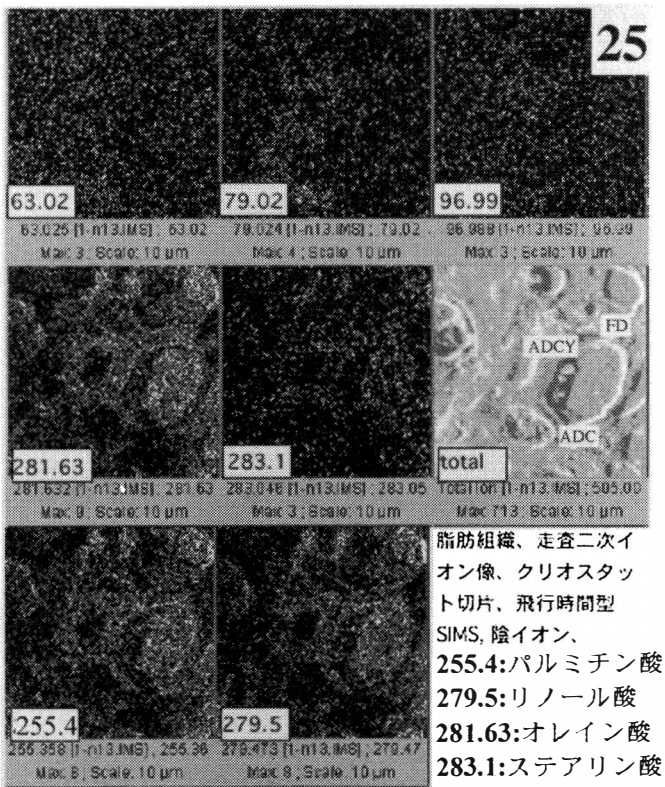


図25. ラット腎臓周辺の脂肪組織のクリオスタット切片をTOF-SIMSで観察した結果です。ADC: 脂肪細胞, FD: 脂肪滴, ADCY: 脂肪細胞の細胞質。

と281のオレイン酸です。脂肪滴に集まっています。パルミチン酸に相当するのが255でステアリン酸は283です。このように脂肪酸に相当する陰イオンを検出すると、構造に相当するところが出てくることがわかります。

このようにいろいろな細胞のなかの物質が分子の質量としてイオン像の分布としてあらわすことができることが明らかとなりました。これらの方法は将来、医学・生物学の多方面に応用されることと思われます。

イオンによる物質の分析は従来、主に工学分野で無機物の分析に用いられてきた手法です。生体試料の分析および有機物の分析に非常に有用であることが明らかとなった今、医学・生物学の多方面に応用されることと思われます。このようなアプローチは国内では前例がなく、将来も富山医科薬科大学が最先端であることを願っております。

5. 終わりにあたって

最後に、英語の専門用語、特に医学用語の多くはギリシャ語やラテン語に由来するものが多くあります。私は学生時代からラテン語に興味を持って学習を続けてきました。この大学に赴任してからガレノスのギリシャ語の原著と、ラテン語の対訳を読む機会を得て、古代の医学に触れることができました。ガレノスは紀元2世紀ころのローマの医学者で当時のマルクス・アレーリウの侍医だった人です。数年前、ガレノスの生誕地と伝えられているトルコのペルガモンを訪れた時、壮大な遺跡の中にアスクレピオスの治療所跡に立つことができ、たいへん感慨深いものがありました。

定年までの3年間、医学科の学生にラテン語入門の講義をする機会を得ることができ大変幸せな事と感謝しています。受講生は皆非常に熱心に取り組み、組織学用語を中心に時間をかけて学習しました。

古代のラテン語とギリシャ語への取り組みと、生体組織・細胞の微細構造の究明について、本大学で講義をする機会が得られたおかげでわずかながら繋がりを見いだすことができたのではないかと自負しております。それも、富山医科薬科大学で教育と研究に携わることを支えて下さった多くの方々のおかげと、感謝いたしております。