

— 話 題 —

光学顕微鏡での病変をそのまま電子顕微鏡で
観察する：LV-SEM を用いて日本医科大学解析人体病理学
清水 章

病理組織診断では、生体内の病変そのものを、組織学的に可視化できるように標本を作製し、主に光学顕微鏡（光顕）を用いて診断を行う。さらに、種々の特殊染色、免疫組織化学染色、および遺伝子検査を駆使して、生体内で進展している病変そのものを解析することで病理診断を行い、診療の一端を担う。組織診断では、光顕を用いることが多いが、必要に応じて蛍光顕微鏡や電子顕微鏡を用いる。電子顕微鏡には、透過型電子顕微鏡（透過電顕）と走査型電子顕微鏡（走査電顕）があるが、病理診断には透過電顕を用いることが多い。

電子顕微鏡は1932年に透過電顕がドイツで開発され、開発者はこの功績でノーベル物理学賞を受賞している。1937年には走査電顕が開発され、日本では1940年に現在の大阪大学にて国産第一号の透過電顕が完成している。光顕は光の透過により対象の形態を観察するため、可視光線の波長以下の対象物はみることができないが、電子顕微鏡は可視光線よりもはるかに波長が短い電子線を用いて観察するため、より小さな対象物を分離して確認することができる。電子顕微鏡は光顕と比較して、高い分解能で高倍率の観察が可能で、電子顕微鏡所見は超微形態所見（ultrastructural findings）と呼ばれる。

電子顕微鏡は、光顕では得られない有用な情報が得られることから病理診断にも応用される。しかし、検体の取り扱いの煩雑さから応用される疾患や領域は非常に限られている。透過電顕では、組織構築の保持のために1 mmほどの小さな検体に強力な組織固定を行うため、蛋白抗原性が低下し免疫組織化学染色には不向きである。また、電子線を効率よく透過するために超薄切片の作製が必要であり、電子線のコントラストを得るためにウラン・鉛を用いた重金属染色を行うなど、その観察には多くのプロセスが必要である。さらに、超薄切片の作製にEpon包埋を行うため、透過電顕観察以外への応用が難しい。

近年、これらの透過電顕観察に必要な検体の制約や煩雑なプロセスを経ることなく、簡便に観察が行える画期的な電子顕微鏡が普及し始めている。この顕微鏡は低真空走査型電子顕微鏡 [Low-Vacuum Pressure Scanning Electron Microscope : LV (LVP)-SEM] と呼ばれ、生物学や医療（診断）分野で使用されている。走査電顕は観察対象に電子線をあて、そこから反射してきた電子（二次電子や反射電子）を観察する顕微鏡で、細く絞った電子線で試料表面を走査しながら表面の微細構造を高倍率で観察する。観察

対象が導電性のない非導電性試料の場合、導電性のあるAuやPt、Cなどの金属を試料表面に被着して高真空モードで観察する。しかし、LV-SEMは、通常の走査電顕の観察に必要な、これらのプロセスも必要なく、簡便に高倍率・高分解能の観察が可能である。また、従来の電子顕微鏡のような専用の部屋は必要なく、卓上型にまで小型化され、光顕並みの手軽さで、誰もがより身近にミクロの世界を体験できるようになった。これら特性を活かして、LV-SEMを用いることで光顕の標本をそのまま電子顕微鏡で観察することが可能になった。

病理診断ではHE染色を用いて光顕で病理検体を評価しているが、そのまま高倍率で評価を行うことが望ましい場合がある。この際、光顕標本のカバーガラスを外した後に、PAM染色やMasson染色などの重金属を用いた染色の場合にはそのまま、それ以外の場合にはPAM染色や白金ブルー染色などの重金属染色を行うことで、LV-SEMによる観察が可能である¹。今までの光顕戻し透過電顕では超微形態観察に限界があったが、走査電顕による組織表面の解析では、確認したい組織構築が保持されていることが多い。また、LV-SEMは病理組織診断ばかりではなく細胞診断にも用いられる。電子顕微鏡検体では特異抗体を用いた免疫組織化学染色は不向きであるが、蛍光抗体法や光顕の免疫組織化学染色法により染色した標本を上記の処置を行うことで、そのままLV-SEMで観察することができ、同一標本上で蛋白の局在と超微形態像の比較観察が可能である²。発色にDABを用いた免疫組織化学染色の場合は、DABの陽性所見をAg+Gold enhancementを用いることで、そのままLV-SEMで観察することも可能である³。さらに、X線検出器を装着することで、試料に含まれる元素やその含有量の分析を行うことも可能で、ヘモジデリンやアスベスト小体、石灰沈着などのFeやCaの沈着を光顕標本のカバーガラスを外すのみで確認ができる。

光顕検体は大きく、またホルマリン固定なので、超微細構造の保持には限界があり、よりよい画像を取得するための工夫が必要である。しかし、LV-SEMでは、光顕の観察後に標本のカバーガラスを外すことで、病変をそのまま電子顕微鏡で観察することが可能である。LV-SEMを用いて光顕でみられる広範囲の領域を簡便に高分解能・高倍率で観察することにより、さらなる病理形態学の大きな発展が期待される。

Conflict of Interest : 開示すべき利益相反はなし。

文 献

1. Lan P, Kang D, Mii A, et al: Evaluation of ultrastructural alterations of glomerular basement membrane and podocytes in glomeruli by low-vacuum scanning electron microscopy. Clin Exp Nephrol 2022; 26: 216-225.
2. Masuda Y, Yamanaka N, Ishikawa A, et al:

Glomerular basement membrane injuries in IgA nephropathy evaluated by double immunostaining for $\alpha 5$ (IV) and $\alpha 2$ (IV) chains of type IV collagen and low-vacuum scanning electron microscopy. *Clin Exp Nephrol* 2015; 19: 427-435.

3. Arai Y, Takeuchi K, Hatanaka S, et al: Heavy metal enhancement technique for diaminobenzidine in immunohistochemistry enables ultrastructural observation by low-vacuum scanning electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 2022; 70: 427-436.

(受付：2022年3月9日)

(受理：2022年3月23日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的の場合、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことができる。