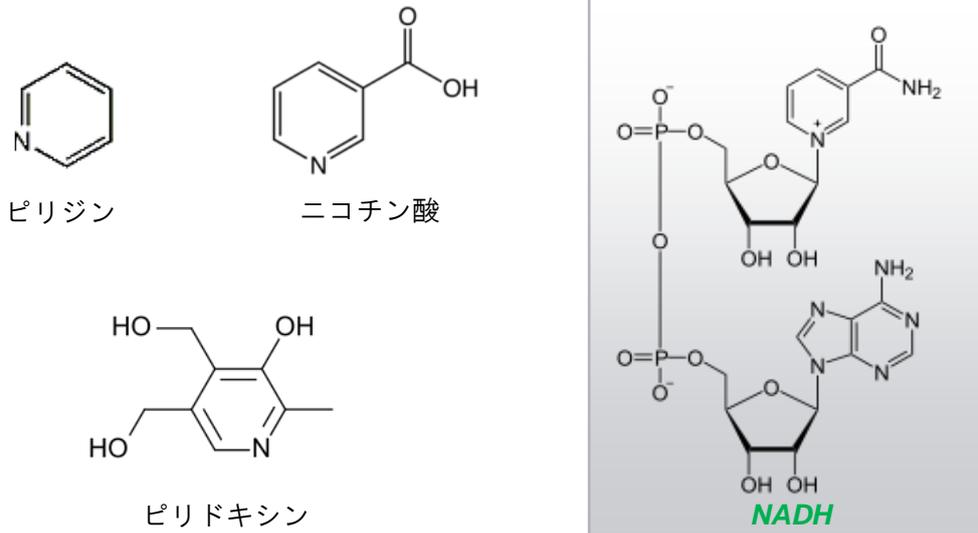


EFIC; Episcopic Fluorescence Image Capture

I. イメージングの原理

・EFIC では生体組織に特定の波長の光を照射した際に発生する自家蛍光を検出して画像化している。

・自家蛍光の由来は『ピリジンヌクレオチド』



・生体内に存在するピリジンヌクレオチドは NADH のみ (単なるピリジン誘導体である VB₃(ニコチン酸)、VB₆(ピリドキシンなど)も自家蛍光に寄与していると思われる)。

・NADH は ATP 産生経路における電子伝達担体であり、すべての細胞に存在することから、EFIC では理論上は全身のあらゆる組織を対象とすることが可能。

・LacZ の発現は自家蛍光を抑制する。

・『ミクロトームによる薄切→CCD カメラによる撮影』を繰り返し、得られた 2D 画像の stack から 3D イメージに再構築。

II. 画像を得るまでのプロセス ～前処理から撮像まで～

(1) 固定

・4%PFA…EFIC サンプル用の固定液として最も好適とされる。組織中のピリジンヌクレオチドを安定的に保持できるだけでなく、蛍光シグナルの増強作用を有するため。したがって、撮像時の露光時間を短縮でき、また低感度のカメラを用いた場合でもシグナルを検出しやすい。

・リン酸緩衝ホルマリン…4%PFA ほど著しくはないが、蛍光シグナルを増強する。ピリジンヌクレオチドの保存性にも優れる。サンプルを固定液中に数週間浸漬した場合でも、ほとんど自家蛍光が減弱しない。

(2) 脱水

・一般的な組織標本と同様、エタノール系列およびキシレンにより脱水する。ただし、エタノールの作用時間の延長は自家蛍光の消失を招くので注意を要する。

表1. ラット胎仔の脚をサンプルとする場合の脱水・包埋の例

	系列	時間(min)		系列	時間(min)
1	70%EtOH	20	8	100%EtOH	10
2	80%EtOH	20	9	Xylene-1	10
3	90%EtOH	20	10	Xylene-2	20
4	95%EtOH-1	10	11	Wax-1	20
5	95%EtOH-2	10	12	Wax-2	20
6	99%EtOH-1	10	13	Wax-3	Over night
7	99%EtOH-2	10			

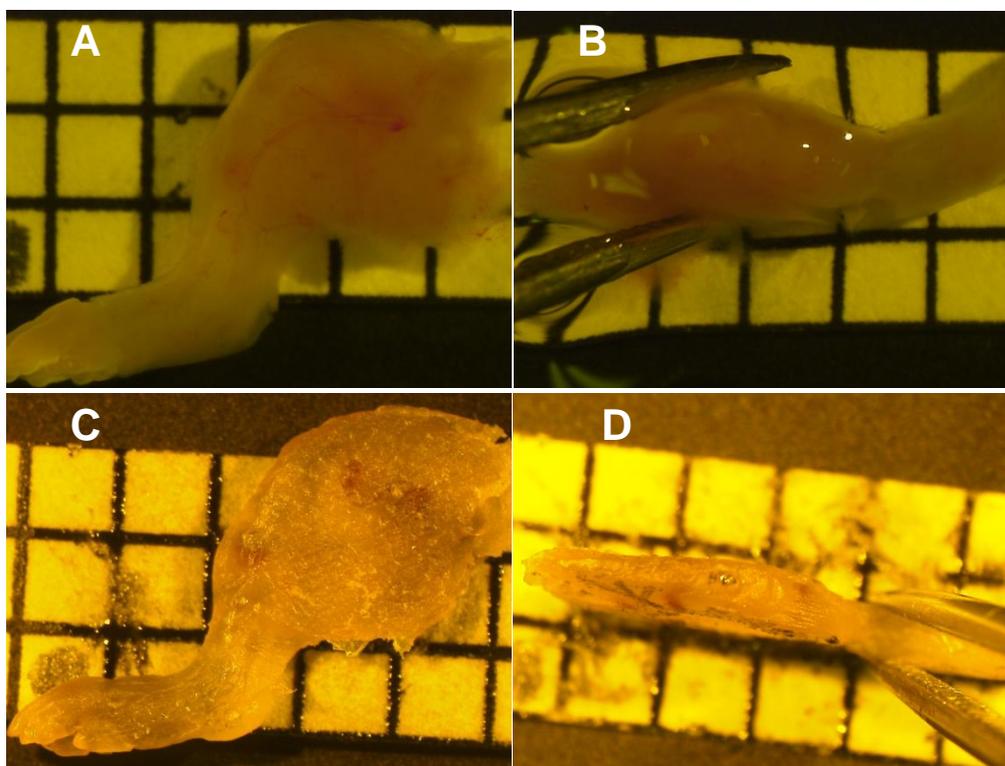


図1. ラット 20 日齢胎仔の右脚の脱水処理前後。A,B: 脱水前. C,D: 脱水後

(3) 包埋

・一般的に用いられるパラフィンを包埋のメディウムとする場合、“bleed through”現象が問題になる。

- ・EFIC ではマイクロームによりスライスされた後のサンプルブロックに励起光を照射し蛍光を検出しているが、ブロックの深層にある組織から発せられた蛍光シグナルが、ブロック表面からのシグナルと同時に検出されてしまうと、得られる 2D 画像が滲んだように(=bleed through)見える。これは単に画像の分解能を低下させるだけでなく、正しい 3D 再構築を行うに当たって重要な問題となる。
- ・包埋メディウムの Wax に赤色アニリン染料である Sudan IV を添加することで”bleed through”は効果的に抑制され、検出される蛍光シグナルは純粋にブロック表面由来のものとなる。
- ・Sudan IV は以下のような理由で、”bleed through”のブロッキング剤として優れている。
 1. サンプル組織との相互作用がほとんど起こらない → 自家蛍光が維持されやすい
 2. Sudan IV 溶解 Wax は液体の状態ではある程度透明性があるため、包埋時にサンプルのオリエンテーションを決めやすい
- ・Sudan IV はパラフィンワックスに難溶であるため、包埋用メディウムに stearin が添加される。さらにメディウムと溶質分子の結合性を高める目的で vyber が添加され、これにより 1 μm のような非常に薄い薄切厚で sectioning する場合においてもブロックから切片をきれいに切り取ることができる。すなわちこれらの添加物は Z 軸方向に対する分解能の向上に寄与している(表 2)。
- ・これらの溶質の添加により、EFIC 包埋用メディウムの融点は通常のパラフィンに比べ高温となっている(融点 75°C)。
- ・その他の包埋方法として、ポリエチレングリコール(PEG)やクリオスタットによる包埋も可能である。これらを使用した場合に得られる画像は、Wax 包埋と比較してコントラストが弱く、分解能も低いが、失われる情報量としては軽微であり、要求される包埋温度が低いことから(PEG : 45°C, クリオスタット: -65°C)、タンパク質や RNA 発現についての分析など、回収切片を利用して発展的な解析を実施する場合に効果的であると思われる。

表 2. EFIC 包埋用ワックスの組成(山田重人先生がアメリカで使っていた配合法です)

Paraffin	56.6g (70.4%)
vyber	20.0g (24.9%)
Stearic Acid	3.50g (4.40%)
Sudan IV	0.35g (0.30%)
Total	80.45g (100%)

- ・この Wax は凝固すると完全に不透明になるため、ブロック内にサンプルがどの位置、オリエンテーションで存在するのかが外から見てわからない。
 - 撮影時に適切なカメラポジションにサンプルを配置することが困難
 - 包埋皿の底に、目印を付けた方眼紙を敷くことで対処(図 2)。

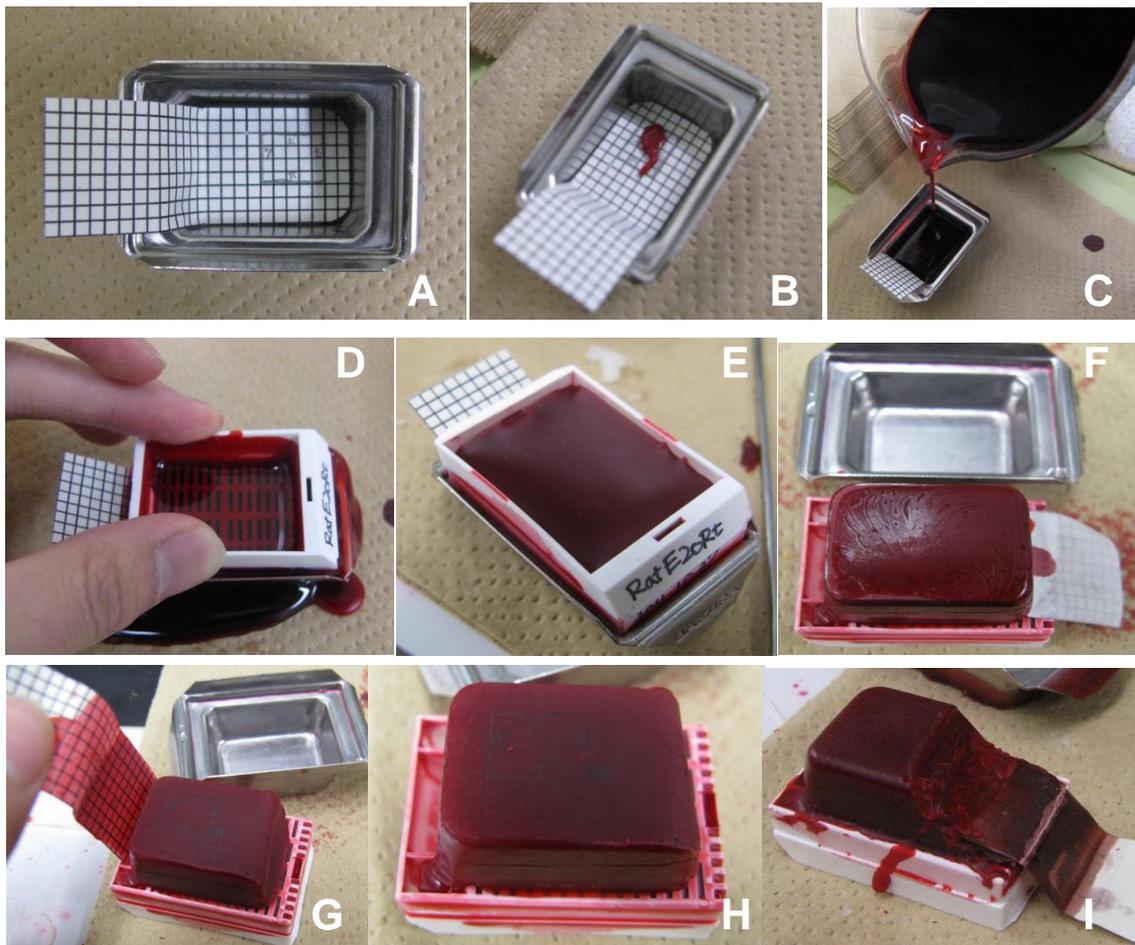


図 2. 包埋工程。方眼紙にサンプルのオリエンテーションが分かりやすいように適当な目印を鉛筆で記入し、包埋皿の底部に敷く(A)。サンプルを載せて Wax を注ぎ込む(B, C)。カセットを包埋皿の上に乗せ、さらに Wax を注ぐ(D)。Wax が完全に凝固後ブロックを包埋皿から取り外し(E, F)、方眼紙を剥がす(G)。ブロック表面に方眼紙に記入したマーク跡が写り(H)、これをカメラ撮影時ポジショニングの目印として活用する。方眼紙の敷き方が悪かった場合の失敗例(I)。

(4)マイクローム画像撮影システム ～滑走型マイクローム Leica SM2500～



図 3

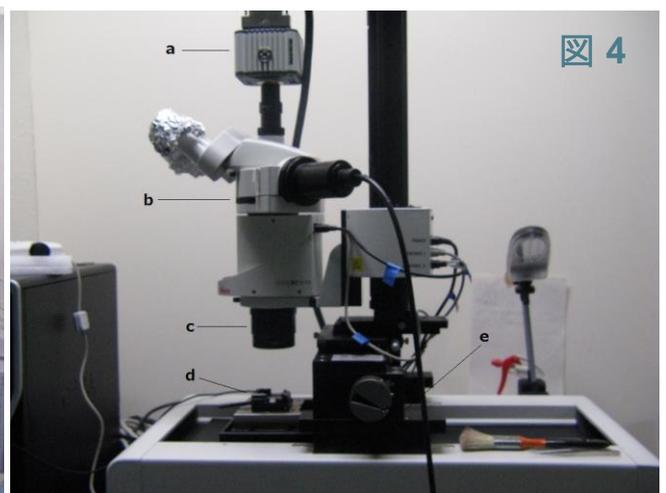


図 4

- ・ステージ(図 4-d)にサンプルブロックを固定。マイクロームは滑走式で、ステージが水平方向に滑走することでブロックが薄切される(図 2)。ステージは顕微鏡(図 4-c)の真下で停止し、その直後に励起光が照射される。CCD カメラで撮影後、ステージは再び刃の手前側へと戻る。これをひたすら繰り返す。
- ・薄切厚、サンプルブロックの刃への進入速度、ストップポジションでの停止時間などは操作板(図 3-①)で設定する。
- ・顕微鏡には光源(水銀ランプ; 図 3-②)、フィルタ(GFP2, GFP3, YFP, DSR の 4 種; 図 4-b)、CCD カメラ(図 4-a)が実装されている。光源からの光は、励起フィルタ通過時に、各種フィルタの特性に応じて特定の波長領域の光のみが選択的に透過して、サンプルを励起する。これにより自家蛍光が発生し、自家蛍光波長のみを選択的に透過させる吸収フィルタを介して、蛍光シグナルを CCD カメラで撮影する。
- ・CCD カメラは PC(図 3-④)と連動しており、PC 内のソフトウェアにより倍率、露光時間、ゲイン、オフセット等の撮影環境を調整する。また、1 回のセクションごとに、これらのパラメータを変化させた複数の条件で撮影することが可能である。なお、撮影された画像は PC 内に保存される。
- ・すべてのセクションにおいて、ステージは全く同じポジションで停止するとともに、顕微鏡とサンプルブロック表面との距離も常に一定である。すなわち、得られる 2D 画像は薄切面に垂直な方向について正確な連続性が保たれており、このことは三次元処理に際して Z 軸方向に『歪みのない』再構成画像が得られることを意味する。
- ・また撮影対象は薄切した切片ではなくブロック表面であるので、X-Y 平面についてもヨレや伸縮、ひび割れなどが生じにくい。
- ・Z 軸方向の分解能は薄切厚に依存するが、前述のように $1\mu\text{m}$ での薄切が可能であることから、その分解能は十分に高いと言える。
- ・X-Y 軸方向の分解能は CCD カメラの性能に依存するが、Hamamatsu Orca ER CCD camera の場合、理論上の最大値は $0.6(\mu\text{m}/\text{pixel})$ である。しかし実際は光の拡散等によりこれより低くなると考えられる。
- ・薄切により得られた切片は、HE 染色などの従来の組織染色に適用することもできる(図 5)。



図 5. 薄切時に回収した切片に対して HE 染色を行ったもの。(左)回収切片を伸展後、スライドガラスに乗せた状態。(右)HE 染色が完了した組織標本。Wax は rehydration 系列のキシレンにより洗い流される。

(5) EFIC Image view

●蛍光コントラストについて

1. 蛍光の由来は NADH →NADH はすべての細胞に存在する→細胞密度の高い組織ほど蛍光強度が大きい(図 6)
2. 蛍光の由来は NADH →ATP 産生が活発で代謝活性の高い組織ほど蛍光強度が大きい(?)
3. 赤血球は励起光の照射を受けて非常によく光る→血管や造血組織は蛍光強度が大きい(図 7)
4. LacZ の発現は自家蛍光を消失させる(?)

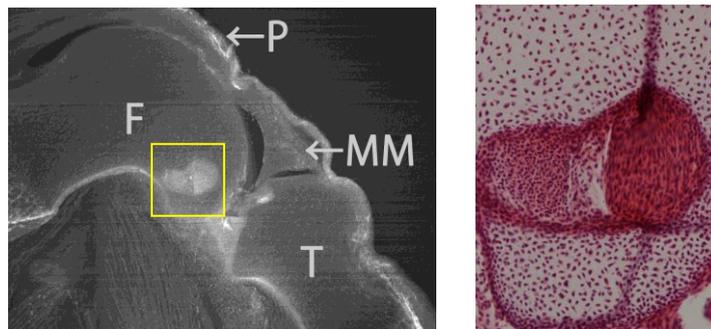


図 6. 細胞密度が高いほど蛍光強度が大きい。(左)ラット 20 日齢胎仔右脚膝関節領域の EFIC 矢状断画像。(右)左の画像で黄色く囲った部分の HE 染色像。高 intensity は後十字靭帯の横断面(大腿骨顆附着部)で、周囲の軟骨組織より高密度で細胞が分布しているため、蛍光強度が強い。(F:大腿骨, T:頸骨, P:膝蓋骨, MM:内側半月)

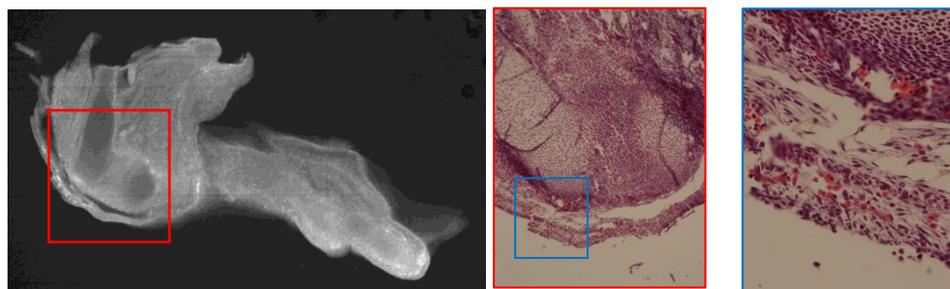


図 7. 赤血球はよく光る。(左)EFIC によるラット 16 日齢胎仔右脚の矢状断の画像。(中央)同サンプルを HE 染色したもの。左画像の赤枠に対応する。(右)中央 HE 画像の青枠について拡大したもの。EFIC で蛍光の強い部分に胎児性赤血球が多くみられる。

●EFIC の長所

1. 分解能が高く、2D、3D ともに高精細なイメージが得られる(図 8)。
2. 2D stack の再構成により得られた 3D 立体像は、任意の断面について切断可能(図 8)。
3. 全体として作業工程はさほど煩雑でない。
4. すべての細胞が自家蛍光能を有するため、全身のあらゆる組織を対象にできる。

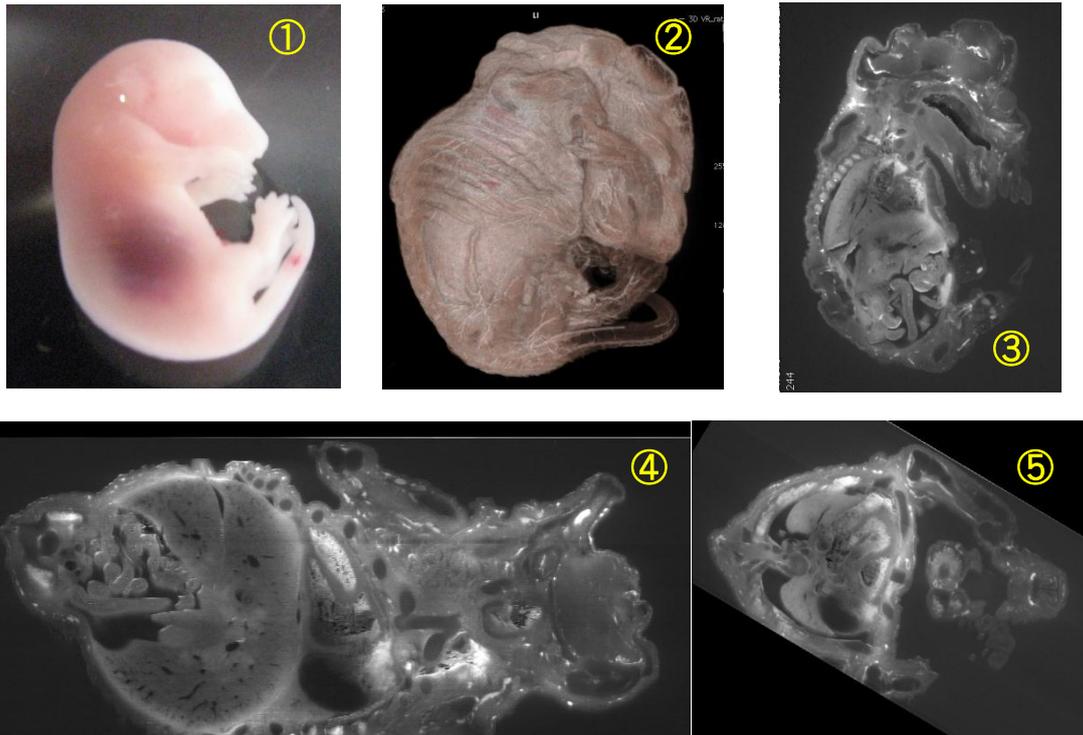


図 8. 20 日齢胎児の EFIC 処理例。①photograph、②EFIC 3D image、③EFIC 2D image(矢状面、薄切面)、④EFIC 2D image(水平面)、⑤EFIC 2D image(前額面)

●EFIC の短所

1. セクショニング時間が長い。
2. 細胞レベルでの観察(個々の細胞の形態や極性、オルガネラの観察など)は不可能。
3. 三次元化処理に当たって、血球の存在が作業の障害となることがある。
4. 日中に長時間暗室の中にいると気分が沈む。