共焦点レーザー走査型顕微鏡による3次元画像解析

Johbu ITOH

Laboratories for Structure and Function Research, Tokai University School of Medicine,
Bohseidai Isehara Kanagawa 259-1193, Japan

TEL: +81-463-93-1121 (Ex.2581) FAX: +81-463-91-1370 e-mail: itohj@is.icc.u-tokai.ac.jp

(Received 28, February 2001 Accepted 11, May 2001)

The recent development of optical microscopy has brought about a more refined and sophisticated apparatus, such as a confocal laser scanning microscopy (CLSM), which was originally described by Minsky (1957), and ever since has been applied to the field of medical biology. In early experiments, only fluorescent signals were detectable by CLSM. However, recent innovations have prompted the possible visualization of non-fluorescent signals such as horseradish peroxidase (HRP) and diaminobenzidine (DAB) signals by CLSM. Moreover, the combination of CLSM and image analysis system (IAS) has enabled us successfully to visualize subcellular organelles three dimensionally (3D) in routinely processed optical microscopic specimens.

In the present review, we applied CLSM to the specimens prepared for optical microscopy, and demonstrated the intracellular identification of subcellular organelles and protein, which were comparable to those observed under electron microscopy. We also applied this microscopy to the observation of tumor angiogenesis and microvessel environment of tumor cells. Both the visualization of subcellular organelles, mRNA and protein products, and 3D images of microvessel environment of tumor cells are discussed in this review.

Key Words: Confocal laser scanning microscopy, immunohistochemistry, three-dimensional imaging, tumor cells, tumor angiogenesis.

I. INTRODUCTION

現在の光学顕微鏡の基礎は、16世紀末オランダ人 H. Janssen, Z. Janssen 父子により発明されたとされており、これが定説となっている。また19世紀半ばドイツの物理学者 E. Abbe によりレンズの光学理論が確立され、それを光学顕微鏡に組み込み、最初に製品化に成功したのは C. Zeiss とされている。

その後、様々な観察方法(照明方法)が開発されたが、中でも1934年にオランダの F. Zernicke により発明された位相差照明法(1954年ノーベル物理学賞受賞)は、染色を施さない生きた細胞をそのまま観察できるという画期的な方法であった。それまでは、細胞を観察するために、いろいろな染料で染色し観察を行っていたわけである。その後、微分干渉照明法が G. Nomarski により発明され、生きた細胞の立体的かつよりダイナミックな観察が可能となった。

1931年ドイツの E. Ruska により磁界型電子顕微鏡が発明される(1987年ノーベル物理学賞受賞)と、一挙に超微形態の世界が広がったのである。

しかし、電子顕微鏡で観察するためには、試料を真空中に置かななくてはならず、生きた細胞(Living Cell)の観

察はきわめて不可能に近く困難であった。近年、医学・生物学領域を中心として、広く高精度の高倍率観察、特に生細胞リアルタイム観察の必要性が求められてきた。この様な背景の中で、光学的には理論分解の限界に達したとされていた光学顕微鏡が、分解能を規定していた光学的回折限界を超える可能性が明らかになった。その結果、開発された新しい顕微鏡の一つがレーザー走査型顕微鏡 Laser Scanning Microscope (LSM) である。LSM は、1951年 Roberts & Young により optical scanning microscope として原理が紹介され、1957年 Marvin Minsky により提唱された共焦点(confocal)の原理を応用し開発されたのが、共焦点レーザー走査型顕微鏡 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) である¹。CLSM は、Living Cell の動態観察やカルシウム動態観察、蛍光抗体法、酵素抗体法などの免疫組織化学、In situ hybridization (ISH)法、Fluorescence in situ hybridization (FISH)法等の分野をはじめとする様々な分野で2次元・3次元・4次元解析などに幅広く活用されている¹⁻⁴。

II. CLSM CONFIGURATION

LSM, CLSM は、スペクトル純度及び輝度が高いとい

うレーザー光をその光源に用いる事により、光学顕微鏡の理論値に近い光学性能を発揮でき、さらにその空間分解能において通常の光学顕微鏡に比べおよそ1.4倍の高い分解能を有する。LSMの画像形成方法は、従来の光学顕微鏡とは異なり、試料標本上をレーザービームがpoint by pointでスキャンし、その各々のpointでレーザー光の反射光・透過光・蛍光を検出器フォトマルチプライヤー (photomultiplier, PMT) で検出しデジタル信号に変換、画像を形成するという方法である。一方 CLSM の画像形成方法は、LSM に、焦点面以外の迷光を除去する目的でのピンホールを付加する方法である (Fig.1)。このピンホールにより、out of focus の迷光を除去、焦点面のみで光で画像を形成する共焦点(confocal)効果を得ることができる。この結果、試料標本の物理的な薄切なしに光学的な薄切(optical sectioning)が可能となる。このことは、組織・細胞の形態を損なうことなく真の情報を得ることが可能で、さらに3次元解析も可能であることを意味している 5-6。

Fig. 1: Schematic drawing of ray path in CLSM.

III. FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CLSM

レーザー光による光信号を検出器 (photomultiplier, PMT) によりデジタル化する方法は、レーザー光特有の干渉性 (コヒーレント) を排除し、様々な電気的処理を可能とする。即ち、画像の濃度、コントラストなどの調整、任意の倍率選択 (ズーム機能) などを可能とする。CLSM の特徴として、Living cell のリアルタイム観察、組織内異種物質の同時観察、細胞機能・形態変化の同時観察、三次元再構築画像の解析いわゆる光学的断層像の取得などが挙げられる。

CLSM 観察には一般に Table 1 に示すような標識蛍光色素が蛍光プローブとして繁用されているが、蛍光プローブの持つ特性 (蛍光の減衰) により繰り返しの観察が困難、電顕観察が困難、永久標本が作製不可能などの問題点がある。しかしながら、蛍光の減衰を防止する目的

で、退色防止剤が市販されるようになり、現在はかなり蛍光の減衰 (退色) を防止できるようになってきている。Table 2 に蛍光プローブ、Table 3 に非蛍光プローブを用いた時の CLSM 観察の長所・短所を示す。

Table 1. Fluorescent dye.

NAME	Excitation (nm)	Emission (nm)
AMCA	347	445
Cascade Blue	374,399	423
FTTC	496	518
DTAF	496	518
BODIPY FL	503	511
TRITC	554	576
Cy3	554	565
LRSC	572	590
Texas Red	592	610
Cy5	649	667

AMCA : 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid
 Cascade Blue : pyrenyloxytrisulfonic acid
 FTTC : fluorescein isothiocyanate
 DTAF : 4,6-dichlorotriazinyl amino fluorescein
 BODIPY FL : 4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indanene-3-propionic acid
 TRITC : tetramethylrhodamine isothiocyanate
 Cy3 : Cyanine 3; indocarbocyanine
 LRSC : lissamine rhodamine sulfonyl chloride
 Cy5 : Cyanine 5; indocarbocyanine

Table 2. Advantages and Disadvantages in Fluorescent CLSM.

Advantages	Disadvantages
Two or three wavelength simultaneous detection	Photo bleaching
Living cell real time detection	Repeated observation, Permanent specimen
3D or 4D detection	difficult

Table 3. Advantages and Disadvantages in Non-Fluorescent CLSM.

Advantages	Disadvantages
Repeated observation	Limited using probes
Permanent specimen	Two or three wavelength simultaneous detection,
3D detection	living cell, 4D detection difficult

酵素抗体法や酵素組織化学の分野での、重金属プローブ (非蛍光プローブ; オスミウム、金、銀、鉛、ニッケル、コバルトなど) の反射特性を活用した反射共焦点観察。またこのほかにも、一般染色標本に用いられる数種類の色素; ①蛍光性を有する色素 (エオジン、メチルグリーンなど)、②反射モードでレーザー光を反射する色素 (DAB, NBT など) を用いた蛍光・反射共焦点観察等がなされている。しかしそれらのいずれの場合でも、その観察像は蛍光像のように、陽性像のみが暗いバックグラウンドに特異的に光輝き、組織細胞の同定が困難であるという欠点を有している。この問題点を克服するために現在一般的に用いられている方法は、明視野観察 (透過光モード) 像にシグナル画像を重ね合わせて組織細胞を同定するという方法である。しかしこの方法も、厳密な意

味では、透過像と共焦点像とでは、その3次元構成要素が異なるため画像判読に際しては注意が必要である。将来この点が改良され明視野共焦点観察法が確立されたならば、組織細胞の同定・反応産物局在部位の確認が一段と精度を上げると確信する。

IV. APPLICATION OF CLSM OBSERVATION

CLSM の特徴（機能）を活用した観察は、やはり Living Cell のリアルタイム観察や、厚い標本の3次元観察が挙げられる。

IV-A. Living cell observation

Green Fluorescent Protein (GFP)

GFP は、発光オワンクラゲの化学発光タンパク質のエクオリンに付随するタンパク質として 1962 年に報告された。その後様々な改良が行われ現在では CLSM で一般的に使用されるアルゴンの 488 nm で最大励起され、なおかつ蛍光強度も増強されるというタイプの GFP が市販される様になり、非常に使いやすくなった。これは、Living Cell 内における細胞内小器官へのシグナルの輸送・構造・経路・速度などを通して細胞の一生を完全に追補する事を可能とした。また GFP 遺伝子に様々な変異を加え、発光波長をシフトさせ Blue Fluorescent Protein (BFP), Cyan Fluorescent Protein (CFP), Yellow Fluorescent Protein (YFP)などの異なる発光色を呈する Fluorescent Protein が開発された。これらの発光タンパク質をそれぞれの物質に旗 (tag) としてラベルする事により、多重ラベル観察や、Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET)解析が行える様になってきた。細胞生物学分野において、生きた細胞や培養細胞に GFP を導入する方法は、通常用いられる蛍光抗体法のように最終的な色素による染色を必要としない。これは細胞の形態的機能的詳細を画像として表現することが可能となることを意味している。

Fig.2. 3D visualization of pEGFP-C1 protein fusion vector transfected to NT2 precursor cells by CLSM.

Figure 2 は、分子生命化学と組織化学の組み合わせによ

る p-enhanced green fluorescence protein (pEGFP)-C1 protein fusion vector を導入した NT 2 前駆体細胞の CLSM 3次元解析像である。pEGFP-C1 は、EGFP の C 末端に異性体蛋白質を結合したもので、それを NT 2 前駆細胞に導入したものである。NT 2 前駆細胞株は、ヒトの胎児性癌 (teratocarcinoma) 細胞由来の神経細胞前駆体へ分化する細胞である。観察から、EGFP と CLSM を融合したこの方法は、光学顕微鏡用標本を使って、電子顕微鏡観察に匹敵する高倍率観察を可能とした。

IV-B. 3D Observation of thick specimens

一例として腫瘍血管新生解析への応用をしめす。

CLSM の蛍光モードで観察を行う為には、目的物に蛍光色素を用いて標識する必要がある。また厚い標本の奥深くまで標識物を浸透させるためには様々な手技を施さなければならない。ここで紹介する方法は、筆者らが確立した蛍光標識ゼラチン注入法 (FITC-conjugated gelatin injection method) である⁷。この方法は、組織血管内に蛍光色素である FITC をゼラチンに標識した溶液を灌流させ、CLSM を用いて、細胞組織と血管との3次元関係を明らかにする方法である。

IV-C. 3D Imaging of tumor angiogenesis of DMBA-induced rat mammary cancer model

Figure 3 に無処置コントロールラットの乳腺と DMBA 乳癌モデルラットにおける腫瘍 (乳癌) 部の血管の3次元立体再構築画像を示す。

Fig.3. 3D imaging of tumor angiogenesis by CLSM.⁷

(a: normal, b: tumor)

腫瘍血管 (Fig. 3b) は、健常乳腺部血管 (Fig. 3a) に比較し、血管密度が増して不整型狭小化・ループ形成などの形態変化を認める。Figure 4 に腫瘍部位の腫瘍細胞と腫瘍血管との2重蛍光シグナル再構築画像を示す。

Fig.4. 3D double projection images of tumor angiogenesis.⁷

腫瘍巣 (nest) の周りを取り囲むように血管が三次元的に観察される。この様に CLSM 観察は、デジタル化された光学的情報のため三次元的な様々な解析方法が可能となる。

Figure 5 に三次元的に分布する腫瘍血管を蛍光強度 (intensity profile) として解析した画像を示す。

Fig.5. 3D signal intensity image of microvessels by CLSM in DMBA-induced rat mammary cancer. The various degree of extravasation of FITC gelatin from microvessels is demonstrated by 3D signal intensity image.⁷

腫瘍部では、血管外でも高い蛍光強度 (signal intensity) を認める。これはマクロモレキュールである FITC 標識ゼラチンが血管外に漏れ出ていること示すものであり、腫瘍血管の透過性亢進を示唆しているものと思われる。このように CLSM では腫瘍血管の形態ばかりでなくその機能的解析にも有用である考えられる。

V. PROBLEMS OF CLSM OBSERVATION

V-A. Discrepancy of signal distribution and localization

共焦点観察は、きわめて有効な観察手段であるが、形態学分野に限定してみると、何れもシグナルは検出されているが、全体の組織細胞の構造の把握は十分になされていない。全体の構造を把握する方法としては、同一ディメンジョンでの透過像 (位相差像、微分干渉像など) に、共焦点画像を重ね合わせる方法を用いている。しかし、厳密な意味でのシグナルの局在観察は、この方法では不十分である。すなわち、透過像はあくまで3次元像の2次元投影像であるからである。この問題を解決するためには、透過共焦点モードでの観察が最も適していると思われる。

V-B. Reappearance of confocal images

共焦点観察の最大の特徴の1つは、いうまでもなく光学的断層像が得られることである。しかし、その再現された画像の再現性については十分に検討する必要がある。

特に全載標本などの厚い標本を観察する場合には要注意である。厚い試料を観察する場合、試料の深部にフォーカシングすると、試料中の光の伝搬により位相がずれて球面収差が発生し3次元分解能が低下する (デフォーカス効果)。また試料内の屈折率や反射率の違いにより結像性劣化をもたらす。使用レーザー光の波長による光学系の透過率、焦点位置のずれ等の問題がある。この様に光学理論的な問題を多々含んでいるので安易に再現された像を盲信しない事が肝要である。

V-C. The damage of specimen by laser lay

光源にはレーザー光を使用しているので当然レーザー光による試料へのダメージが起こる。特に Living cell の観察時には要注意である。本来の細胞が正常に機能している環境下での観察を心がける事が肝要である。形態と機能との相互関係を観察する際には最も重要な要素となる。また波長が短くなれば (紫外線レーザー光) レーザー光そのものが細胞へ与える悪影響 (Phototoxicity) が発生し更に注意が必要となる。

VI. CONCLUSION

CLSM は、試料標本に含まれる隠された情報を可視化し、細胞内小器官などの微細構造物の固体識別 (identification) を可能とした。特に Living Cell など電顕観察不可能な試料標本に対しても倍率的には電顕に近い観察を可能とし、さらに4次元観察も可能とした。今後に期待することとして、明視野下での透過共焦点画像を得ることであり、それにより一層生命現象の“ダイナミックな動き”を総合的に把握・可視化 (Visualize) することが可能となるであろう。現在、その光学的解像力を電顕レベルに近付け、組織・細胞の各々の細胞内微細構造物 (細胞内小器官) の、屈折率・反射率・透過率・散乱率の違いを検出することにより、画像形成を行う新しい試みがなされつつある。今後の CLSM の更なる発展に期待したい。

REFERENCES

- ¹ 藤田哲也監修: 新しい光学顕微鏡 学際企画 (1995)
- ² 伊東丈夫: 改訂版 光学顕微鏡写真撮影法 学際企画 (1998)
- ³ 高松哲郎: CONFOCAL LSM の原理と応用 - 組織や細胞の断層像をみる - 組織細胞化学 1995, 日本組織細胞化学編, pp. 7-15 学際企画 (1995)
- ⁴ J Itoh, RY Osamura, K Watanabe: JHC 40:955 (1992)
- ⁵ 伊東丈夫: 免疫組織化学と in situ hybridization のすべて, 病理と臨床 18: pp. 304 (2000)
- ⁶ J Itoh, N Sanno, A Matsuno, Y Itoh, K Watanabe, RY Osamura: MRT 39:157 (1997)
- ⁷ J Itoh, K Yasumura, T Takeshita, H Ishikawa, H Kobayashi, K Ogawa, K Kawai, A Serizawa and RY Osamura: AQCH 22:85 (2000)