

構造化照明が可能にする、診療用腎生検光学顕微鏡標本を再利用した腎足突起・ミトコンドリア病変の定量分析

糸球体上皮細胞の足突起癒合や尿細管上皮細胞のミトコンドリア障害（形態的には断片化や膨化）は、腎臓病の発症・進展に関与する。これらの微細構造変化を可視化するためには、通常は電子顕微鏡が必要であるが、腎生検組織の大部分は光学顕微鏡標本として処理されており、小さな電子顕微鏡用サンプルを観察しただけでは重要な病変を見落とす可能性があった。このため、光学顕微鏡標本を用いて採取組織全体にわたって前述の病変を評価する方法の確立が望まれていた。

病理組織染色用色素は明視野における可視化に最適化されているが、これらの色素には各色素特有の蛍光特性がある。大阪大学大学院 医学系研究科 腎臓内科学の松本あゆみ先生、松井功先生、猪阪善隆先生らは、病理組織染色用色素が有する蛍光特性に着目し、追加の蛍光染色を行うことなく、腎臓病診断用に作製された病理プレパラートをそのまま構造化照明超解像顕微鏡N-SIM Sで観察し、足突起およびミトコンドリアの病変を定量分析する方法を確立した。本アプリケーションノートでは、その報告におけるN-SIM Sの活用事例を紹介する。

キーワード：N-SIM S、超解像、構造化照明、腎臓病、腎生検、EMT染色プレパラート、非蛍光染色

研究概要

通常の超解像顕微鏡観察では、観察目的に沿った蛍光免疫染色プレパラート等が用いられる。大きな組織サンプルであれば観察目的ごとに新たに蛍光免疫染色プレパラートを作製すれば良いが、腎生検サンプルは直径1 mmにも満たない円柱状組織であり、蛍光免疫染色切片を新たに作製することはサンプルロスにつながりかねない。このため、診療目的で作製済みのプレパラートから、糸球体上皮細胞足突起情報や尿細管上皮細胞ミトコンドリア形態情報を直接取り出せれば有用であると考えられていた。

病理染色用色素には各色素特有の蛍光特性があるため、日常診療で作製されたHE、PAS、PAM、EMT染色プレパラートを、そのまま構造化照明超解像顕微鏡N-SIM Sを用いて観察した。その結果、エラスチカ-マッソントリクローム（EMT）染色プレパラートを用いることにより、前述の微細構造を可視化できることが判明した（図2a、b、図3a、図4）。

また本研究では、フーリエ変換を用いて観察された微細構造変化を定量化する手法を確立した。本手法を用いてヒト腎生検サンプルの評価を行ったところ、糸球体上皮細胞足突起の破綻度と尿蛋白量における相関（図2c）や、ミトコンドリア構造の破綻度と腎機能低下速度における相関（図3b）がみられた。

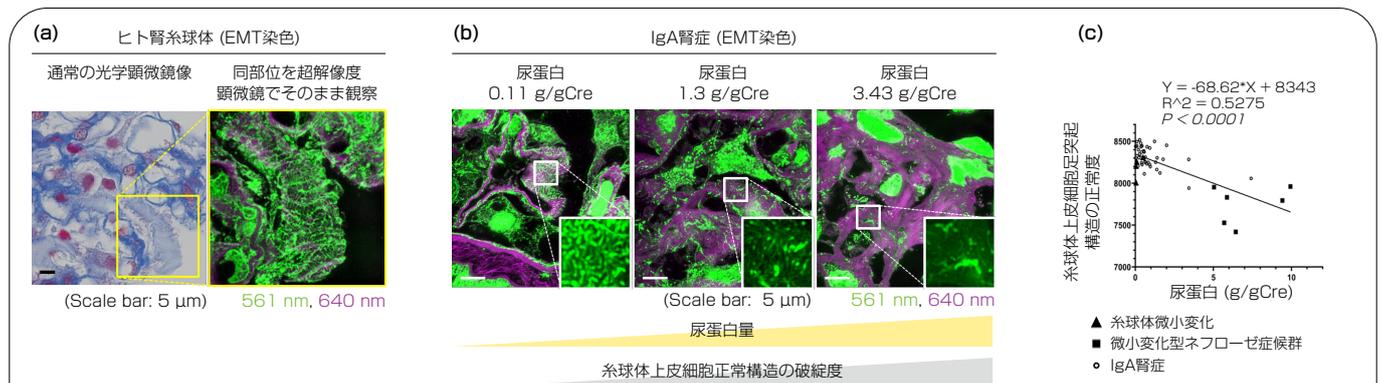
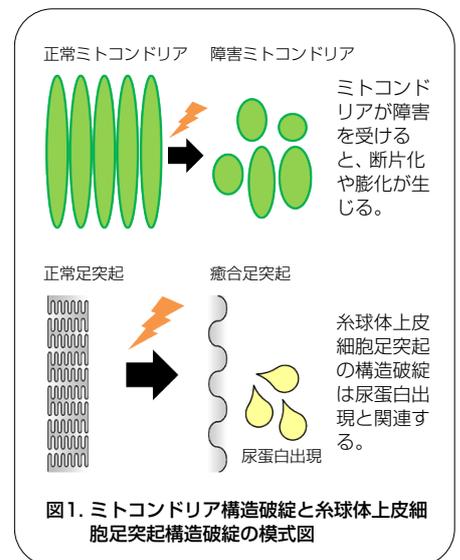


図2. 構造化照明超解像顕微鏡N-SIM Sを使用した、EMT染色切片におけるヒト糸球体上皮細胞構造破綻の可視化と定量化

(a) EMT染色ヒト腎組織をN-SIM Sで観察すると、561 nm励起（緑）では糸球体上皮細胞足突起、640 nm励起（マゼンタ）では基底膜が描出される。

(b) IgA腎症患者において、尿蛋白量が多い症例ほど足突起の構造破綻度が強い様子が観察された。

(c) 糸球体微小変化（ほぼ正常構造を保つ症例）、微小変化型ネフローゼ症候群、およびIgA腎症の患者において、足突起の破綻度と尿蛋白量には相関関係が認められた。

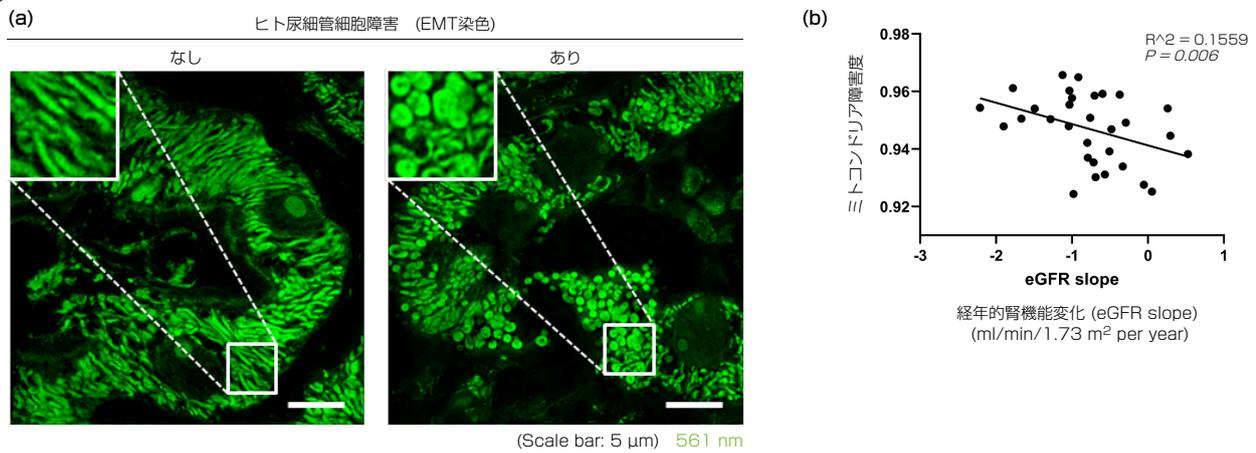


図3. 構造化照明超解像顕微鏡N-SIM Sを使用した、EMT染色切片におけるヒト尿管細胞ミトコンドリア障害の可視化と定量化

- (a) EMT染色ヒト腎組織の尿管管間質領域をN-SIM Sで観察すると、561 nm励起によりミトコンドリアが描出された。細胞障害のない部分では櫛状に並んだミトコンドリアが観察され、障害を有する部位では断裂・膨化したミトコンドリアが観察された。
- (b) 観察された変化をフーリエ変換を用いて定量化したところ、IgA腎症患者において、腎生検時のミトコンドリア障害度と腎生検後の腎機能低下速度に相関関係が認められ、ミトコンドリア障害度が将来の腎機能低下を予測する可能性が示された。

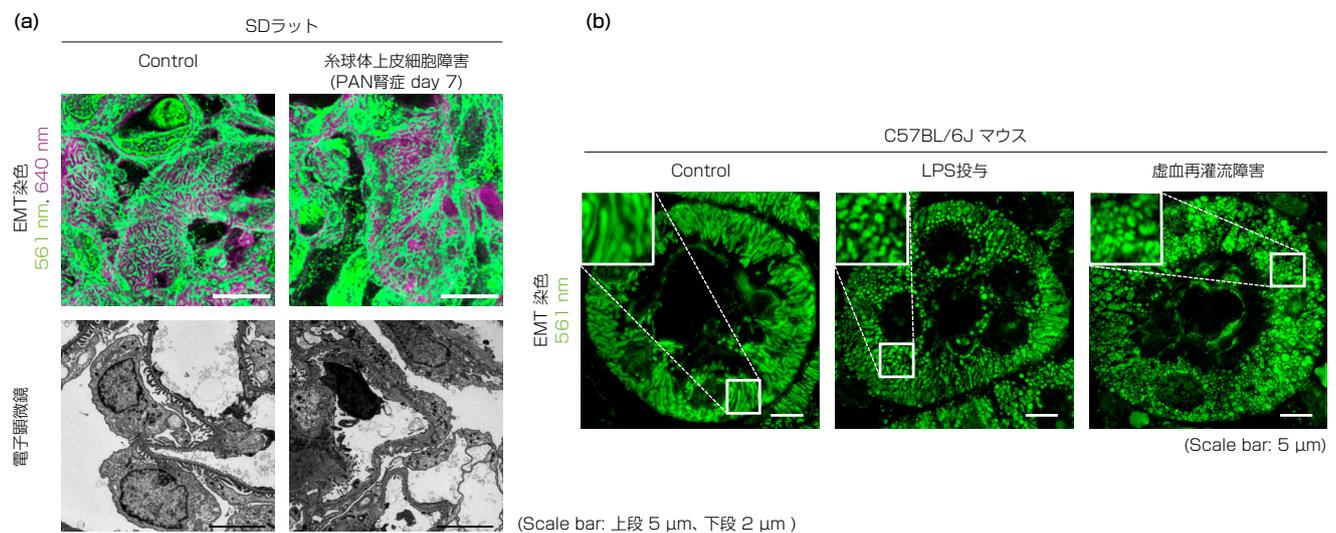


図4. 構造化照明超解像顕微鏡N-SIM Sを使用した動物モデルの糸球体上皮細胞構造破綻およびミトコンドリア障害の可視化

EMT染色組織を用いて動物モデルの腎病変も描出可能である。

- (a) 正常ラットの糸球体領域では糸球体上皮細胞足突起構造が観察可能であり、障害モデル (PAN腎症) では同構造の破綻が観察された。これらの微細構造変化は、電子顕微鏡で得られた所見と同様であった。
- (b) LPS投与もしくは虚血再灌流障害による尿管管間質障害マウスモデルでは、尿管管上皮細胞におけるミトコンドリアの断片化や膨化が観察された。

まとめ

光学顕微鏡用病理染色標本を用いて、ヒト腎生検組織の糸球体上皮細胞足突起癒合度および尿管管上皮細胞ミトコンドリア障害度を定量評価できることを明らかにした (図2, 図3)。また、これらの微細構造変化が臨床パラメータと相関することを明らかにした。腎障害動物モデルにおいても、疾患に伴う糸球体上皮細胞足突起やミトコンドリアの構造変化が観察可能であった (図4)。

病理染色色素は強力な光により退色するため、STED顕微鏡で病理染色組織を観察することは難しい。しかしながら、構造化照明超解像顕微鏡N-SIM Sを用いれば、病理染色標本の色素を退色させることなく超解像画像を取得可能であった。本手法を用いることで、ヒト生検組織から従来以上に有用な情報を引き出し、病態を詳細に把握できる可能性がある。

参考文献

Quantitative Analyses of Foot Processes, Mitochondria, and Basement Membranes by Structured Illumination
Kidney Int Rep. 2021 Jul; 6(7): 1923-1938.
 Published online 2021 May 1. doi: 10.1016/j.ekir.2021.04.021
 Ayumi Matsumoto, Isao Matsui, Yusuke Katsuma, Seiichi Yasuda, Karin Shimada, Tomoko Namba-Hamano, Yusuke Sakaguchi, Jun-ya Kaimori, Yoshitsugu Takabatake, Kazunori Inoue and Yoshitaka Isaka

製品情報

超解像顕微鏡 N-SIM S

構造化照明顕微鏡法 (SIM) により、従来の光学顕微鏡の約2倍の解像度で標本の微細構造を取得可能。

- ・ 水平解像度：115 nm (3D-SIM)、86 nm (TIRF-SIM)
- ・ Z軸方向解像度：269 nm (3D-SIM)
- ・ 視野サイズ：最大66 μm \times 66 μm (100X対物レンズ使用時)

