

かんたん光顕-走査電顕相関観察

Correlative Light Electron Microscopy

-コアファシリティーにおける生産性向上-

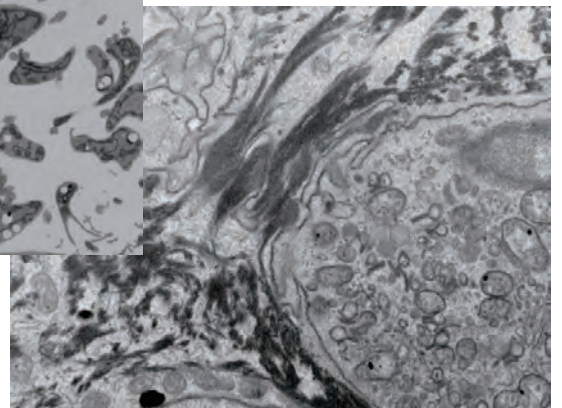
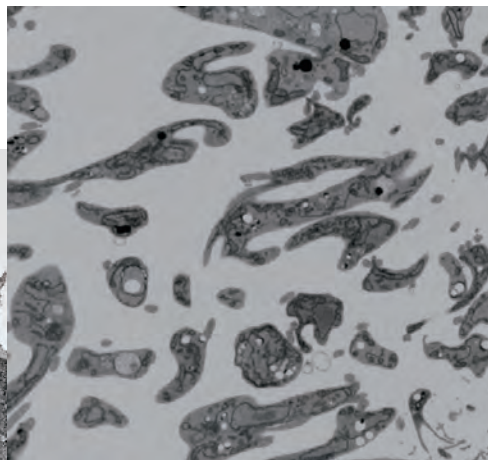
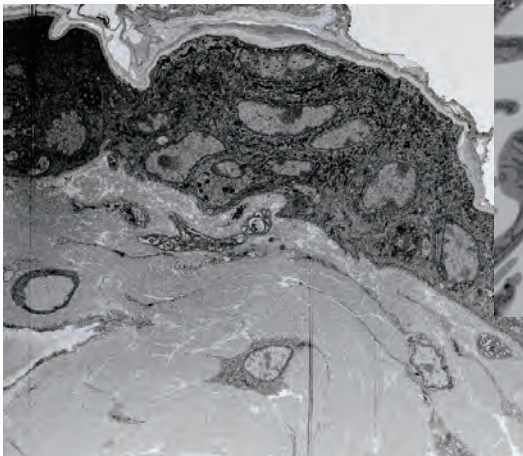
久留米大学医学部先端イメージング研究センター

太田 啓介



先端バイオイメージング支援

組織細胞の空間解剖
連続断面から3Dを再構築



コア・ファシリティーとしての研究サポート

電顕：

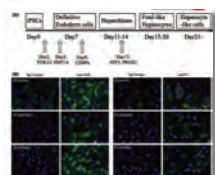
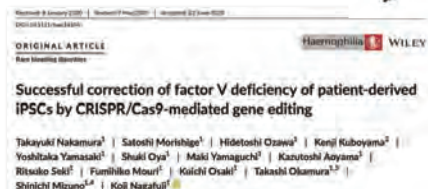
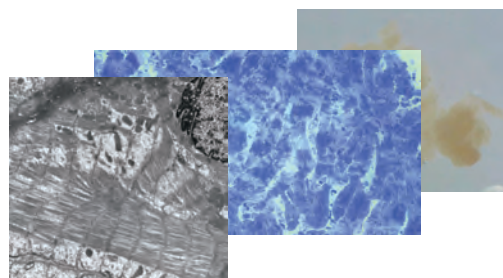
TEM2台, FE-SEM,
LV-SEM, FIB-SEM

光顕：

CLSM, MP etc



腎・心筋生検の検索



66th **AIRC**
Advanced Imaging Research Center

先端イメージング研究センター

前身：久留米大学医学部内

電子顕微鏡室

1955年 (S30) 設立

竹重順夫先生
山田英智先生 徳安清輝先生
村上正浩先生 谷川久一先生

共焦点レーザー顕微鏡室

1994年 (H5) 設立

猪口哲夫先生

2017年 先端イメージング研究センター 設置

中村桂一郎 センター長 高度なイメージング技術の確立と共同研究体制

透過型電子顕微鏡 X2
走査型電子顕微鏡 X2
FIB-SEM

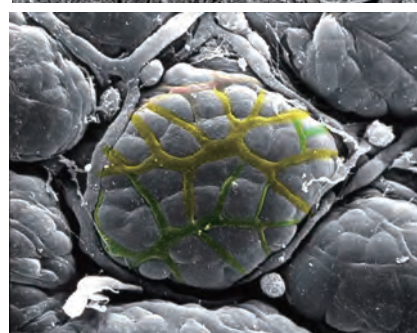
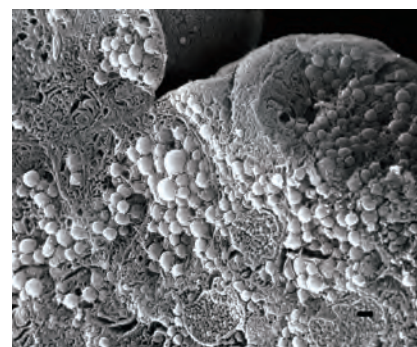
超解像+共焦点レーザー顕微鏡
多光子顕微鏡



本館創立当時



国産初の商用FE-SEM (HFS-2)

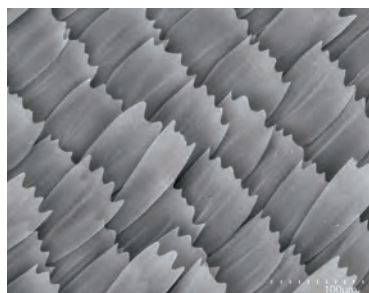


大学のコアファシリティの利用実績

2017年度 センター設立時の状況

• TEM	年間約5200枚		
• FIB/SEM	約4000時間	反射電子によるBFI画像	OK
• FE-SEM	16時間	反射電子によるBFI画像	X

BFI: Block face Image

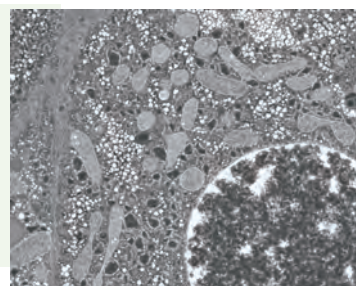


久留米大学において

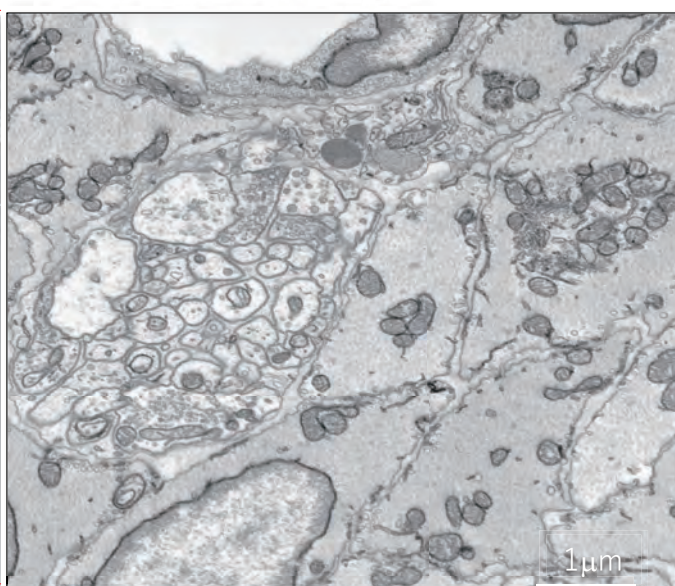
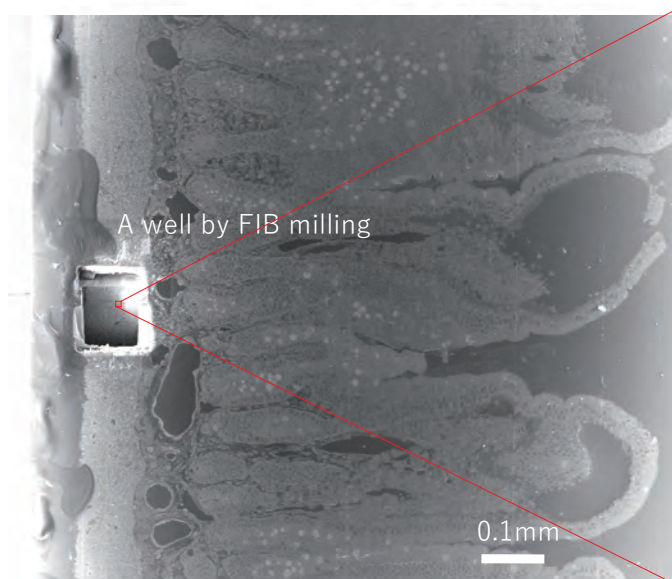
従来のSEM観察需要



SEMによる組織観察



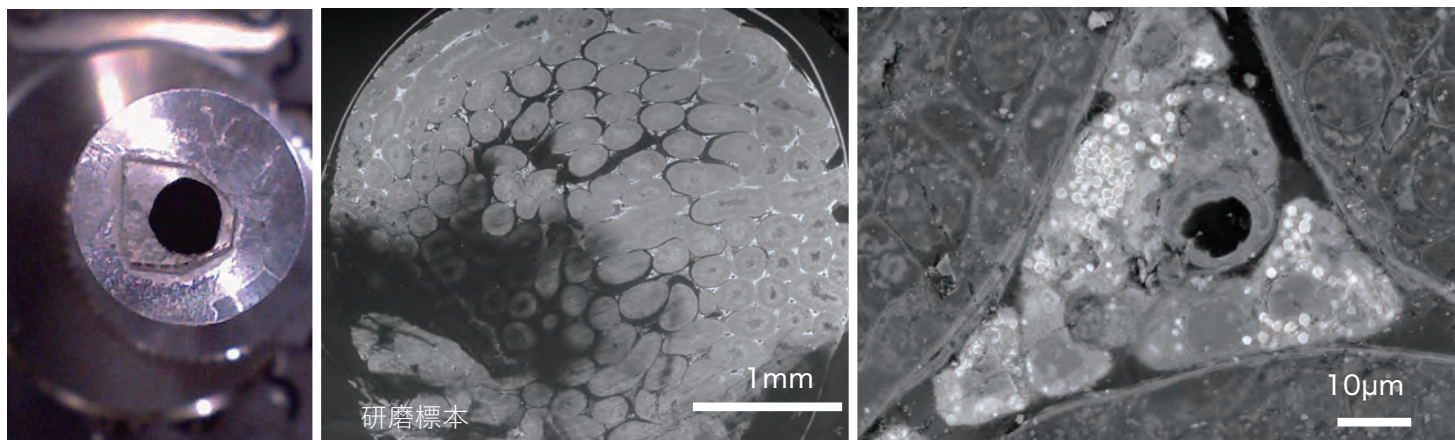
SEM ブロック表面観察法 Block Face Image



反射電子検出器の向上により
TEM用の切片、ブロック表面から直接組織像が得られる

SEM ブロック表面観察法 Block Face Image

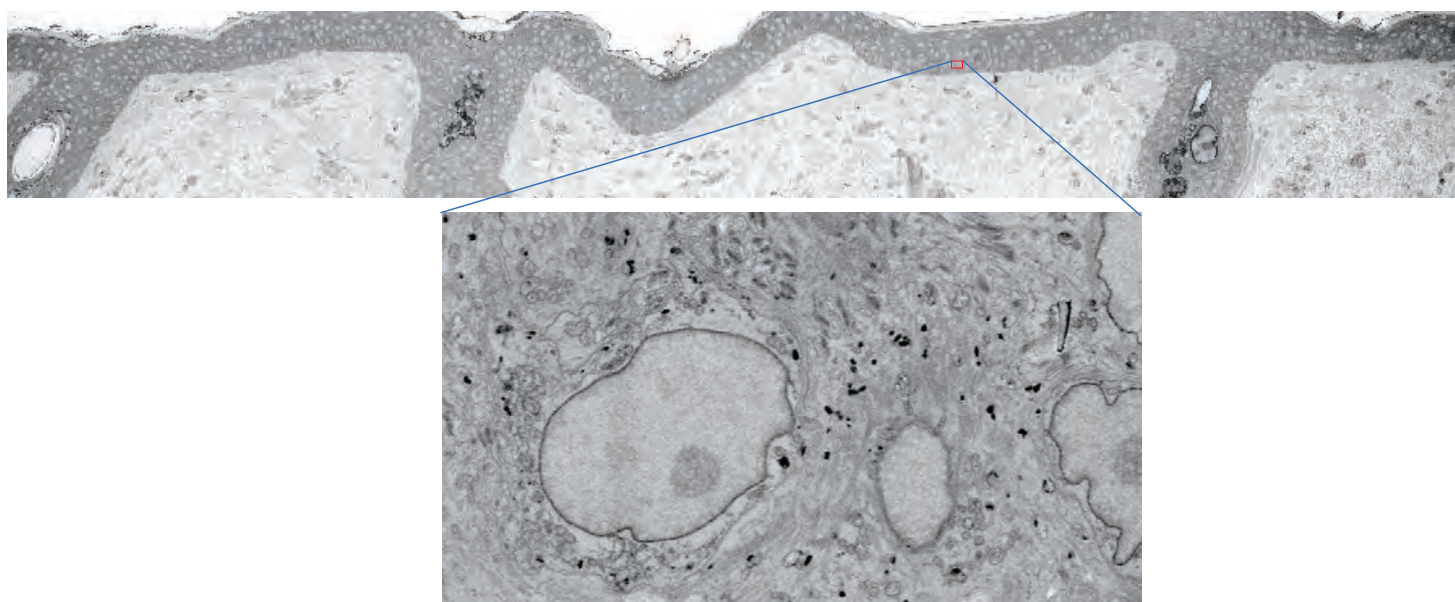
大型組織のスクリーニング



反射電子検出器の向上により
TEM用の切片、ブロック表面から直接組織像が得られる

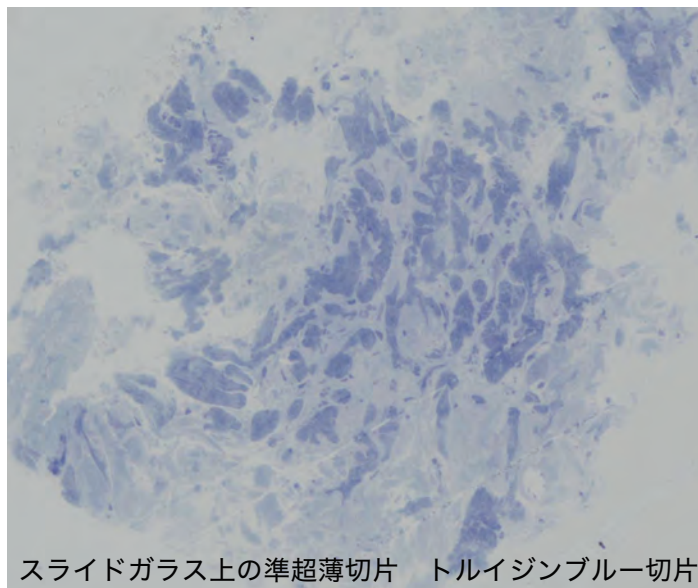
SEMのBFIが生産性向上に寄与

理由 1. 組織の全体像が観察できる！



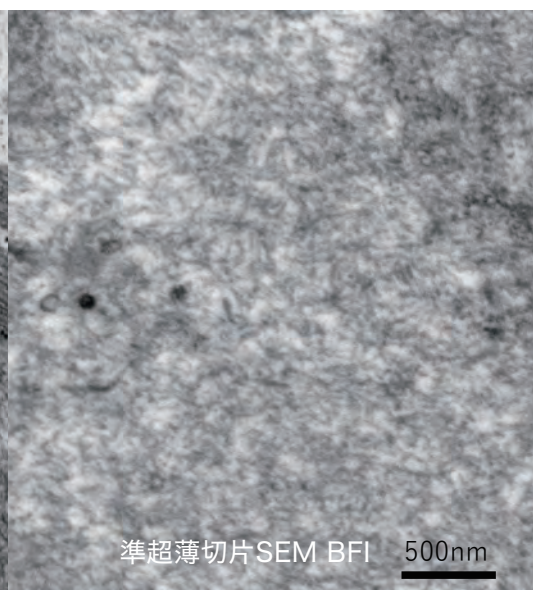
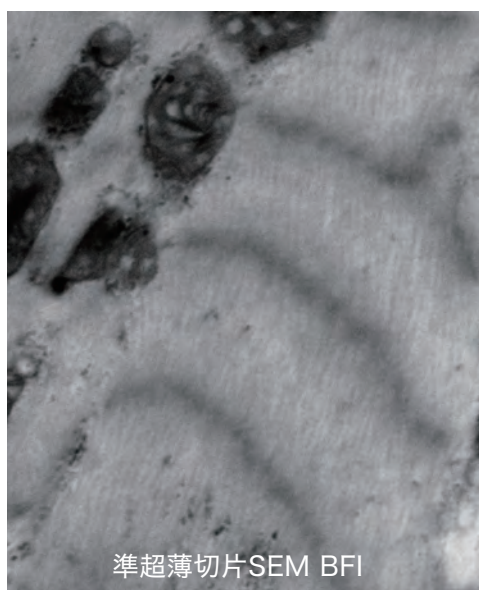
SEMのBFIが生産性向上に寄与

理由 1. 組織の全体像が観察できる！



SEMのBFIが生産性向上に寄与

理由 1. 組織の全体像が観察できる！



SEMのBFIが生産性向上に寄与

理由1. 組織の全体像が観察できる！

理由2. もし準超薄切片でいろんな染色ができればHappy？

申し訳ありません。

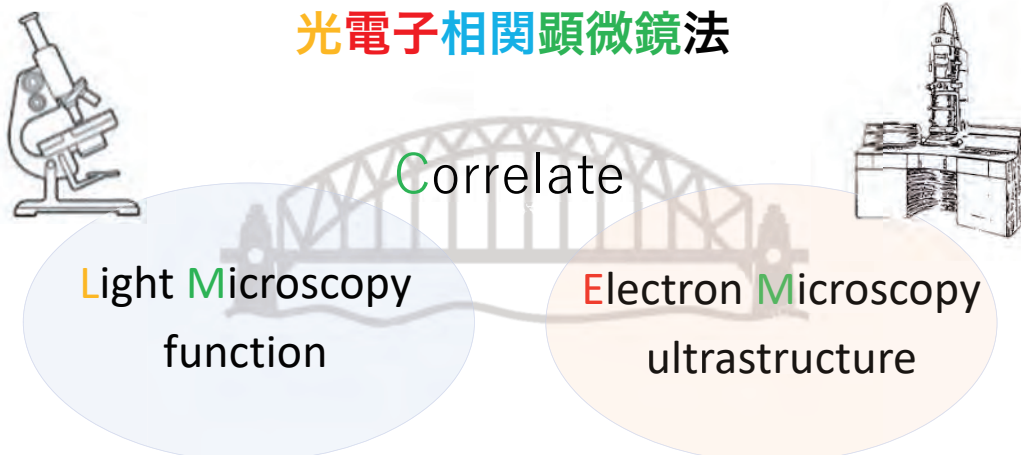
未発表データですので詳細は省きます。

ところでCLEMって？

光学顕微鏡で観察したその場を 電子顕微鏡で見る技術

Correlative Light and Electron Microscopy

光電子相関顕微鏡法



光学顕微鏡観察と電子顕微鏡観察とにおける試料作製の違い

電顕と光顕の違い

		光顕	電顕
観察範囲(FOV)		mm-10 μ m	100 μ m-0.1 μ m
試料作成	試料・観察環境	含水・液中	完全脱水・真空中
	観察	Live	Snapshot
	観察対象	タンパクの分布	形
	試料固定	弱	強 (グルタルアルデヒド + OsO ₄)

**機能
の可視化**



**微細
構造**

同じ試料の同じ場所を見るのは難しいですか？

光学顕微鏡観察と電子顕微鏡観察とにおける試料作製の違い

電顕と光顕

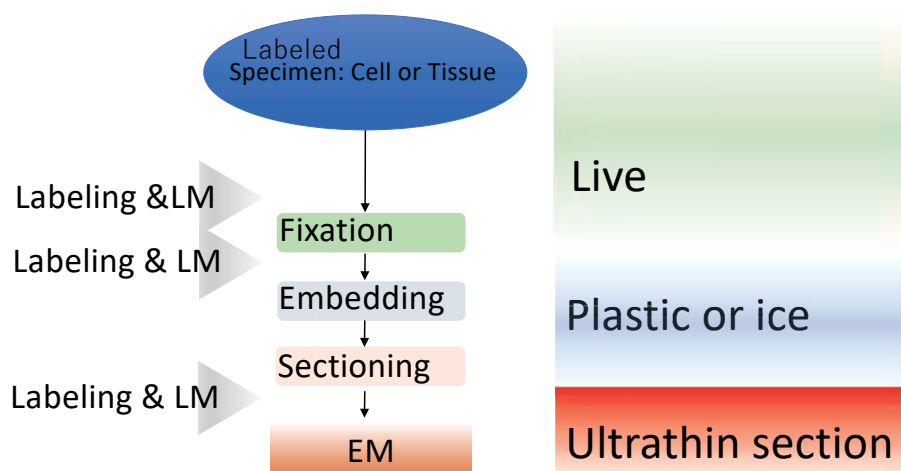
そもそも観ている物が違う

光学顕微鏡観察と電子顕微鏡観察のギャップ

	光学顕微鏡	電子顕微鏡
現象 結像原理 相互作用の強さ	光子と原子の相互作用 光の屈折 (光学レンズ) 低	電子と原子の相互作用 ローレンツ力 (電子レンズ) 強
一般的分解能	1 μ m	数nm
情報	光子の位相・散乱・吸収 蛍光・発光	電子散乱 (反射電子)・二次電子 特性X線・CL
情報源	色素・蛍光色素など	元素分布 (重元素)
透過試料の厚さ 固定 免疫染色のプロープ	数 μ m 弱 (ホルムアルデヒドなど) 色素・蛍光色素	数十nm 強 (グルタルアルデヒドなど) DAB-OsBlack, コロイド金など

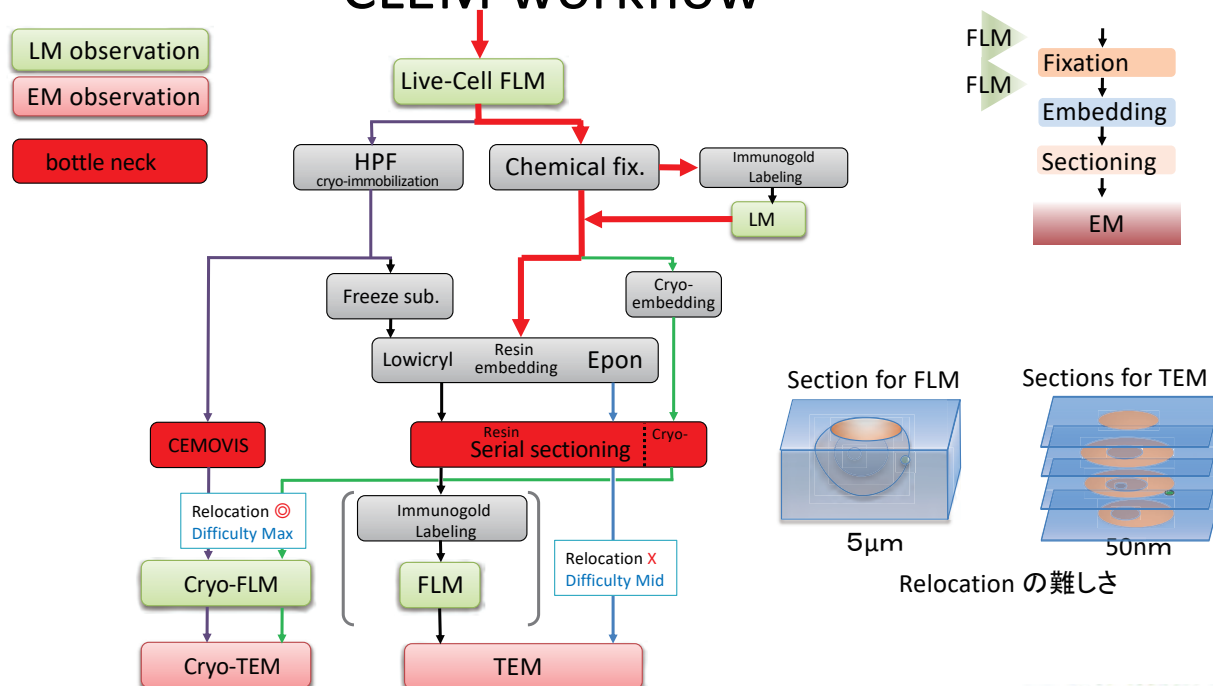
同じ試料の同じ場所を見るのは難しいですか？

基本的 workflow

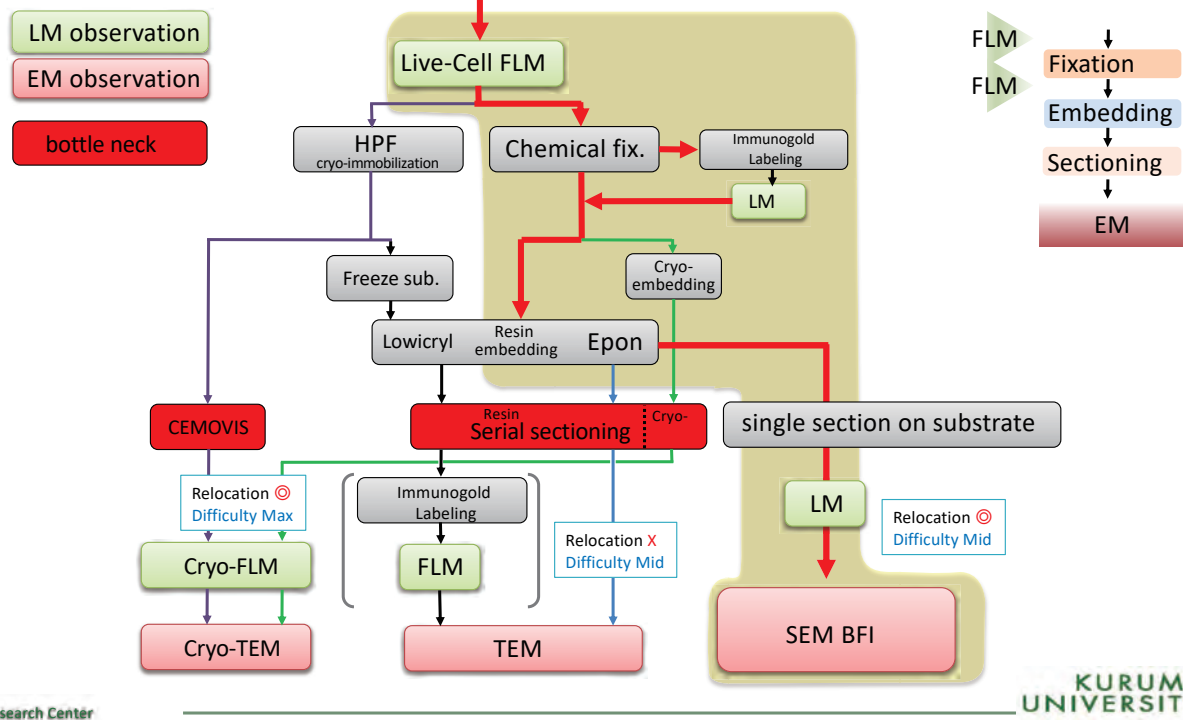


何を重視するのか？形態？局在？
どんな試料作成を行うのか、どんなプローブ/
染色を使うのか？

CLEM workflow



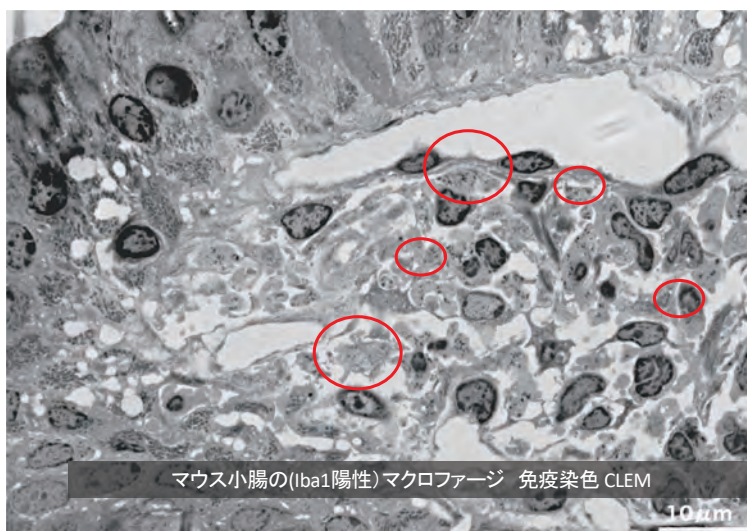
SEMをつかったかんたんCLEM workflow



Array Tomography

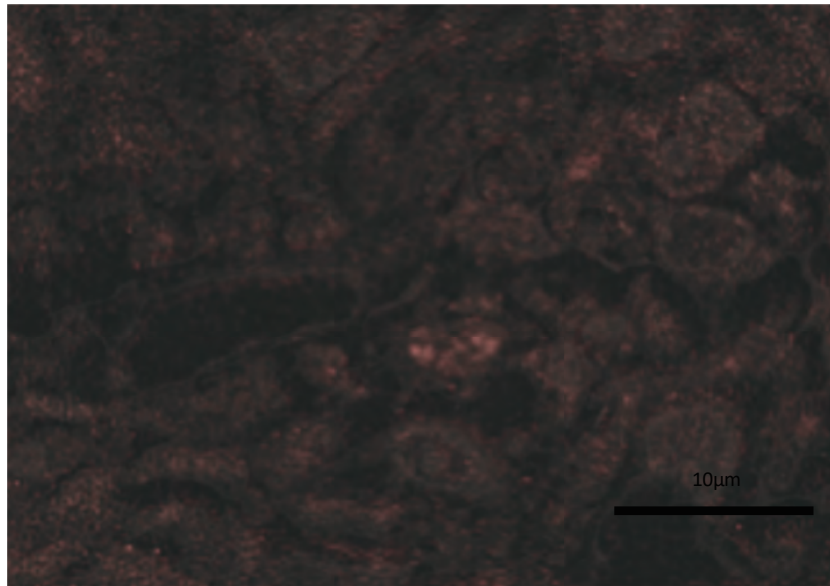
Micheva D. Array Tomography
Neuron, 55(1): 25-36, 2007

CLEM on section with SEM



Fixation 4% Formaldehyde
(+ 0.1% glutaraldehyde)
Dehydration: ethanol series
Embedding: LR White resin
Semithin sectioning (0.5μm)
take on a slide glass
Immunohistochemistry:
Fluorescence LM
(OsO₄ coating)
SEM (Back scatter electron)
Acc. 3kV~7kV

CLEM on section with SEM



コアファシリティーとしてSEMはどっち？
⇒コアとしては両方欲しいです。



低真空簡易SEM 導入

2019年3月

目的

迅速観察



FE-SEM YAG 検出器付き 導入 (JSM-IT800)

2021年3月

高分解能
連続切片観察

久留米での低真空簡易SEM迅速観察を交えた 第一弾研究ワークフロー

コンサルティング



どんなサンプル？
何が観たい？
いつまでに？

LM観察

薄切(準超薄切片) ⇒ 染色 ⇒ 低真空SEM BFI観察開始
パラフィン切片
Cryostat切片

できるだけ短期間

30分でとりあえず
結果を返す！

7分 3分

⇒ 上司に相談

Option ⇒ 導電処理 ⇒ 高分解能観察

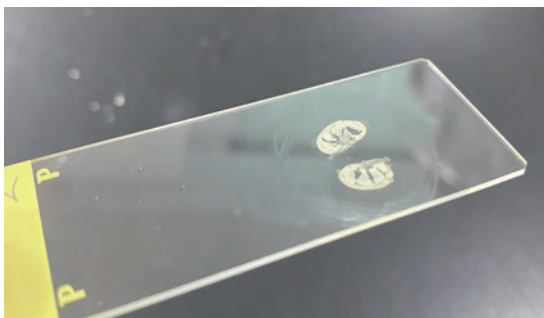
40分

パラフィン・凍結切片のSEM観察もかなり人気

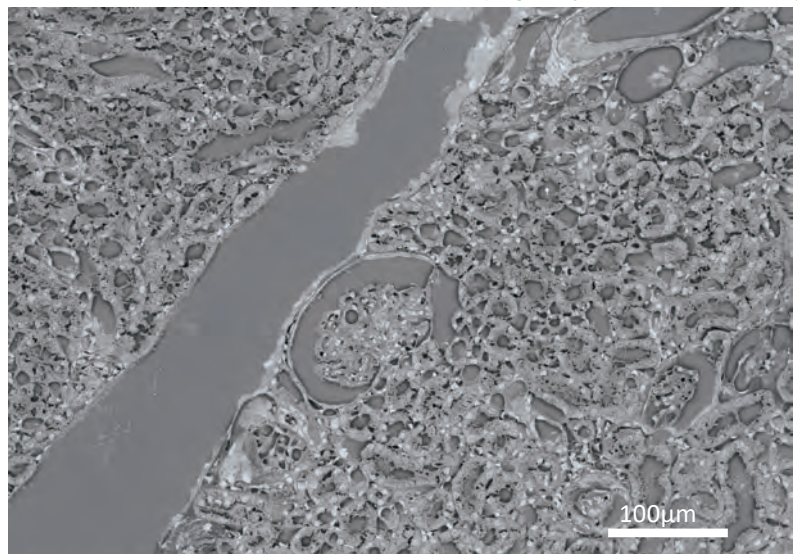
仕事が早いからだと思います。



切って
洗って
染めて
乾燥
10分



電子染色 酢酸ウラン液などで3分

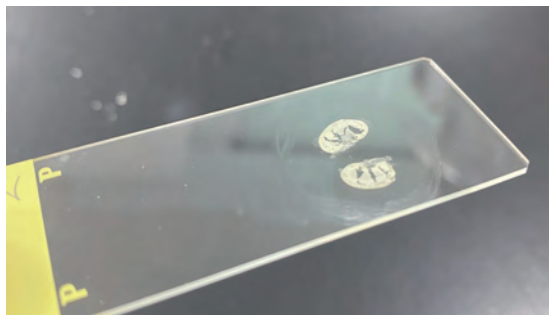


パラフィン・凍結切片のSEM観察もかなり人気

仕事が早いからだと思います。

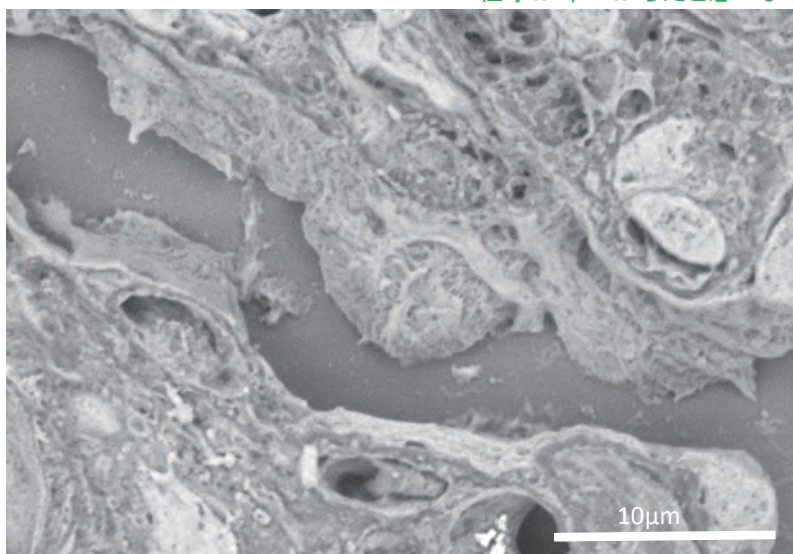


切って
洗って
染めて
乾燥
10分



電子染色 酢酸ウラン液などで3分

— Advanced Imaging Research Center



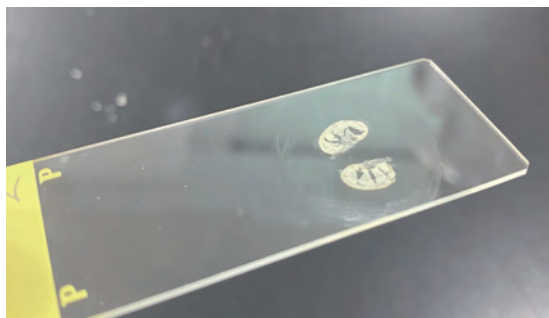
KURUME
UNIVERSITY

パラフィン・凍結切片のSEM観察もかなり人気

仕事が早いからだと思います。

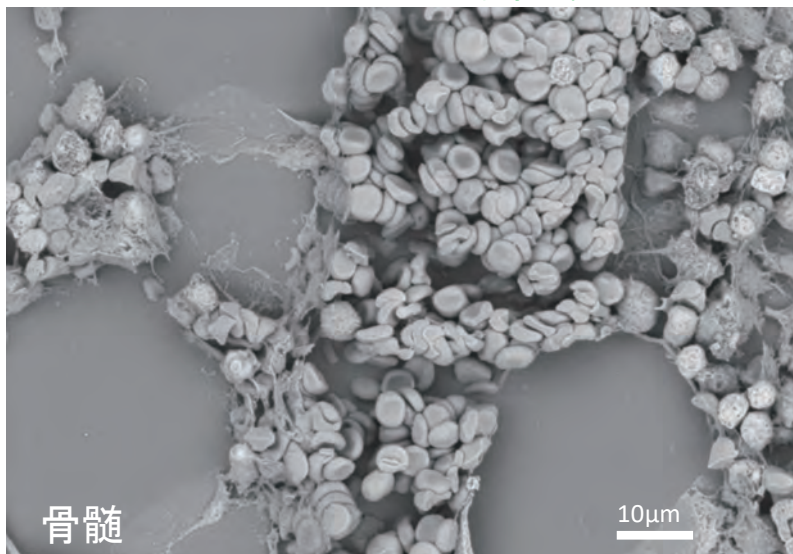


切って
洗って
染めて
乾燥
10分



電子染色 酢酸ウラン液などで3分

— Advanced Imaging Research Center



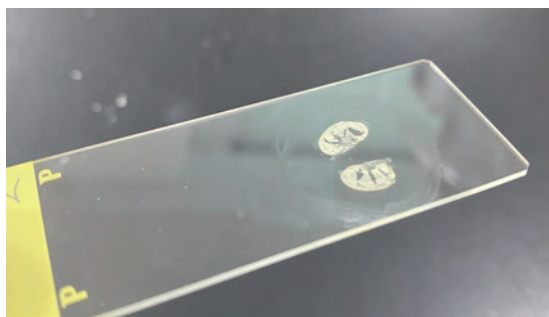
KURUME
UNIVERSITY

パラフィン・凍結切片のSEM観察もかなり人気

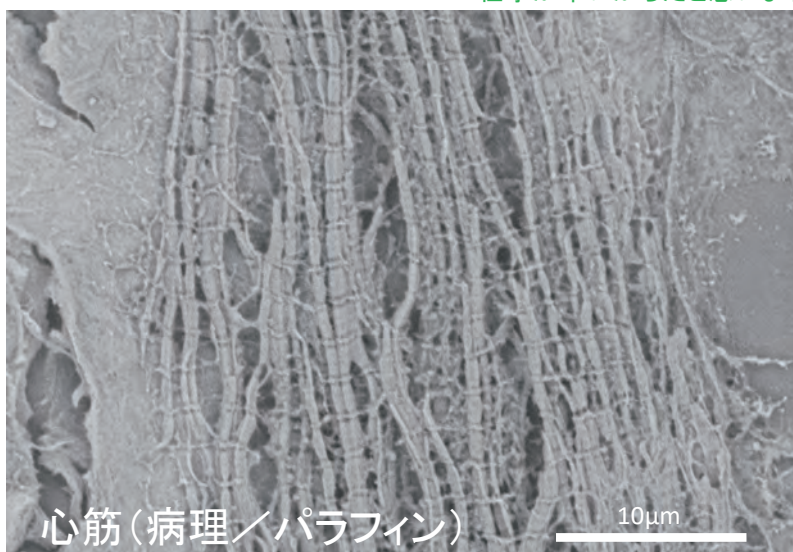
仕事が早いからだと思います。



切って
洗って
染めて
乾燥
10分



電子染色 酢酸ウラン液などで3分



心筋(病理／パラフィン)

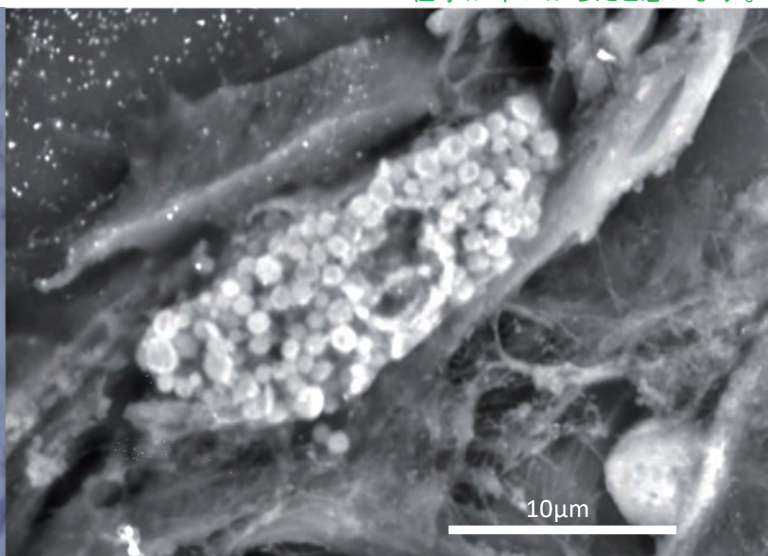
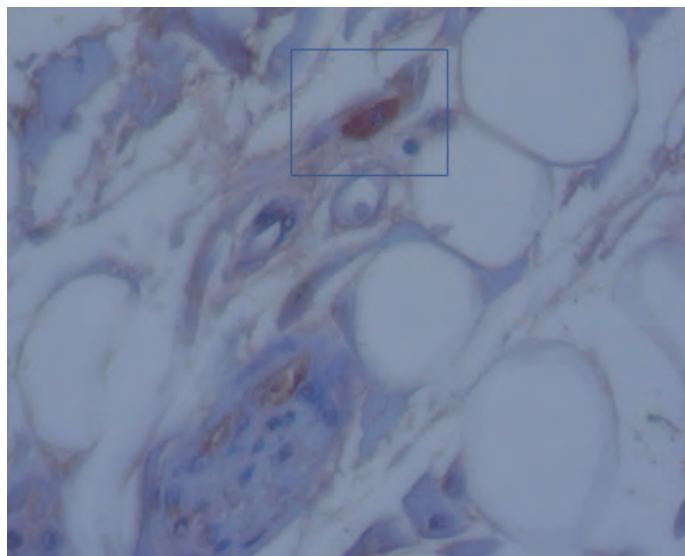
10μm

— Advanced Imaging Research Center

KURUME
UNIVERSITY

パラフィン・凍結切片のSEM観察もかなり人気

仕事が早いからだと思います。



10μm

DABもよく見えます。

— Advanced Imaging Research Center

KURUME
UNIVERSITY

かんたんCLEMは電顕観察のパラダイムシフト

利用実績 SEMの方は比較できるデータがありませんが、
TEMの利用数・利用者数が増えています。

TEM 2017 5200枚/年 ⇒ 2020 6800枚/年

固定概念

電顕は時間がかかる
形しか見えない

SEMの簡単CLEM
パラダイムシフト

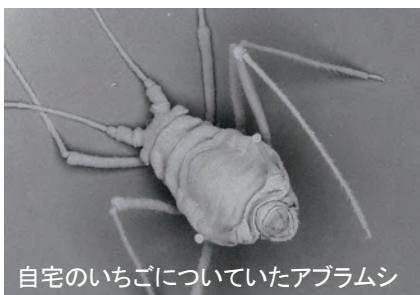
すぐデータになる。
機能分子との相関もまあできる



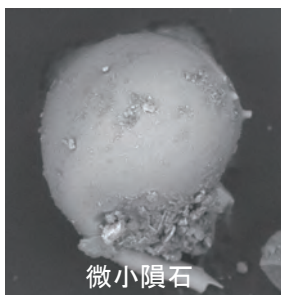
SEMはアウトリーチ・科学教育にも



久留米大学 夏休み
顕微鏡体験
ワークショップ



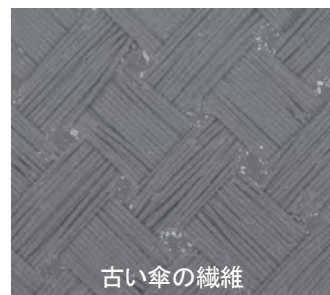
自宅のいちごについていたアブラムシ



微小隕石



ジガバチの足底ブラシ



古い傘の繊維

Correlative Light Electron Microscopy

かんたん光顕-走査電顕相関観察 -コアファシリティーにおける生産性向上-

- ・一時期医学生物では少し下火になりましたが最近は、古典的なSEMに回帰される研究者も増えてきました。
- ・もちろんTEMもその他の高度なImagingも大切ですが電子顕微鏡の画像が読める方が減った今だからこそSEMは早く、しかも説得力の高いデータを提供できます。

ありがとうございました。

謝辞

kohta@kurume-u.ac.jp

先端イメージングセンタースタッフ

都合亜記暢・船津貴志・築島沙季

久留米大学 解剖学講座

中村桂一郎・平嶋慎吾・力丸由紀子・常吉理紗・岩佐尚美

久留米市

末次 智

日本電子株式会社の皆様