

WS III-3

3次元内部構造顕微鏡を用いた蛍光観察

横田秀夫 ((財) 神奈川科学技術アカデミー)

我々は、試料を切断してその断面を観察することにより、試料全体の内部構造を観察する3次元内部構造顕微鏡を開発し、種々の試料の観察を行ってきた。しかし、観察に白色光を用いた装置では、コントラストの少ない試料や高倍率での観察は困難であった。一般に蛍光物質を用いた試料の観察は染色部が発光することから、通常の染色法に比べて検出感度が高いとされている。そこで、試料観察部に落射蛍光顕微鏡を用いた装置を試作し、蛍光染色した試料の観察を試みた。

試作した装置は、試料送りの分解能は最小 $0.5 \mu\text{m}$ 、観察時間は最高5断面/秒、試料冷却温度は最低 -50°C が可能であった。試料の撮影には落射蛍光顕微鏡と高感度CCDカメラを用い、対物レンズは2~80倍、蛍光波長はU, B, G励起が可能であった。撮影した断面画像は追記式レーザーディスクに1断面ごとに記録した。記録した断面画像を用いてワークステーションとボリュームレンダリング法により立体像の構築を行い、試料内部の構造の観察を行った。

本装置を用いて胎児体内の遺伝子の局在の観察を行った。観察対象はICR系マウス11.5日齢の胎児(体長8 mm)体内の癌原遺伝子(c-kit)とした。母体から摘出した胎児はPFAで固定した後Whole mount fluorescence in situ hybridization法を用いて、FITC標識したDNAプローブ(c-kit)で染色した。染色後、不透明化した凍結包埋剤で包埋し、 -35°C で凍結したのち装置に装着した。試料は、切削の厚さ $3 \mu\text{m}$ 、蛍光波長B励起、対物レンズ2倍、ミクロトーム用ディスポーザブルナイフで切削・記録した。観察断面は約2,500枚、観察に要した時間は約45分であった。全断面記録終了後、断面画像から立体像の構築と任意断面の観察を行った。胎児体内の脊髄、内蔵に蛍光が認められ、c-kitの局在が観察できた。

蛍光観察が可能な装置を試作し、試料を蛍光染色することにより、従来観察することが困難であった、遺伝子のように微細な物質の局在を明らかにすることに成功した。