

X線CTによる腎臓の微細構造観察

国島 直樹*

リガクのnano3DXは実験室ベースの高分解能X線顕微鏡であり、観察試料のX線投影像をCT再構成することにより、非破壊的な立体構造観察を可能とする。我々は、実験室ベースX線顕微鏡の生体アプリケーションの一例として、X線CTによる腎臓の微細立体構造観察を試みた。重元素試薬で染色しシート状に樹脂包埋したマウス腎臓切片をnano3DXで観察した結果、腎臓の機能単位であるネフロンをミクロンレベルの空間分解能で立体表示することに成功した。さらに、独立した5個のネフロンのCT画像について詳細な統計解析を行い、近位および遠位と呼ばれる異なる尿細管が重元素染色の輝度値により区別できることを示した。実験室ベースX線顕微鏡の今後の展開として、医療診断や構造生物学における活用が期待される。

1. はじめに

X線顕微鏡法はX線の高い透過性を利用することにより分厚い試料の内部を非破壊的に観察するイメージング技術である。さらに、X線顕微鏡による撮影で得られる一連の投影像をComputed Tomography (CT)と呼ばれる計算手法で処理することにより立体像を再構成することができ、その結果、非破壊的な立体構造観察が可能となる。リガクのnano3DXは、ユーザーにとって利用しやすい実験室のX線源を利用する、実験室ベースのX線顕微鏡である⁽¹⁾。実験室ベースのX線顕微鏡を使ったX線CT法は工業材料などに広く適用されており⁽²⁾、最近では生体試料への適用⁽³⁾⁻⁽⁵⁾もいくつか報告されている。本稿では、生体アプリケーションの一例として、nano3DXによるマウス腎臓の微細構造観察⁽⁵⁾について紹介する。

2. nano3DXの概要

nano3DXの装置外観を図1に示す。装置本体はヒトの背丈ほどの高さで、中央の試料ステージに観察試料をセットし、左側からX線を照射し、右側のカメラで試料を透過したX線投影画像を撮影する。カメラ内では透過X線がシンチレータにより光に変換され、光学レンズにより光検出器の検出面に結像する。本装置では試料を検出器に近付けて撮影する方式を採用しているため、従来の拡大投影方式のX線顕微鏡に比べて熱による光源ゆらぎの影響を小さくすることができ、その結果、ミクロンないしサブミクロンレベルの高分解能観察を実現している⁽¹⁾。X線顕微鏡の理論的背景⁽⁶⁾および生体アプリケーションの総説^{(7),(8)}については別

の報告を参照されたい。ここでは生体試料の観察について簡潔に述べる。

生体試料は主に軽元素で構成されるため、その観察では多くの場合、画像コントラストの低さが問題となる。コントラストを得るためには、まず観察試料を透過するX線が試料に適度に吸収されるように、適切な波長のX線を選択することが重要である。nano3DXでは4種類のターゲット(Cr, Cu, Mo, W)からの波長の異なる特性および連続X線を選択する方式になっており、ほとんどの生物試料観察では比較的コントラストが得やすいCuまたはMoターゲットが使用される。コントラストが十分かどうかは投影像を1枚撮ってみることで判断でき、試料中の注目部分が入射X線の50-90%を透過する状態がよい。コントラストが不十分な場合に検討すべき項目は、波長選択、トリミングによる試料サイズの調整、および各種のコントラスト増強である。例えば、画像処理によるコントラスト増強が可能であり、代表的な方法として位相回復^{(9),(10)}が挙げられる。位相回復は無染色の生体試料にも適用可能で、生きたパンジー種子試料を位相回復で観察し、種子内部の胚を立体表示した例⁽³⁾が報告されている。一方、造影により実験的にコントラストを増強することもできる。例えば、今回紹介するマウス腎臓試料に適用されているように、重元素を含む適切な試薬を用いて染色することにより、生物試料の吸収コントラストを増強する。また、無染色生体試料中の水をよりX線透過率の高いパラフィンなどに置換することによりコントラストを増強することも可能で、パラフィン包埋マウス腎臓の糸球体を立体観察した例⁽⁴⁾が報告されている。

*株式会社リガクX線研究所

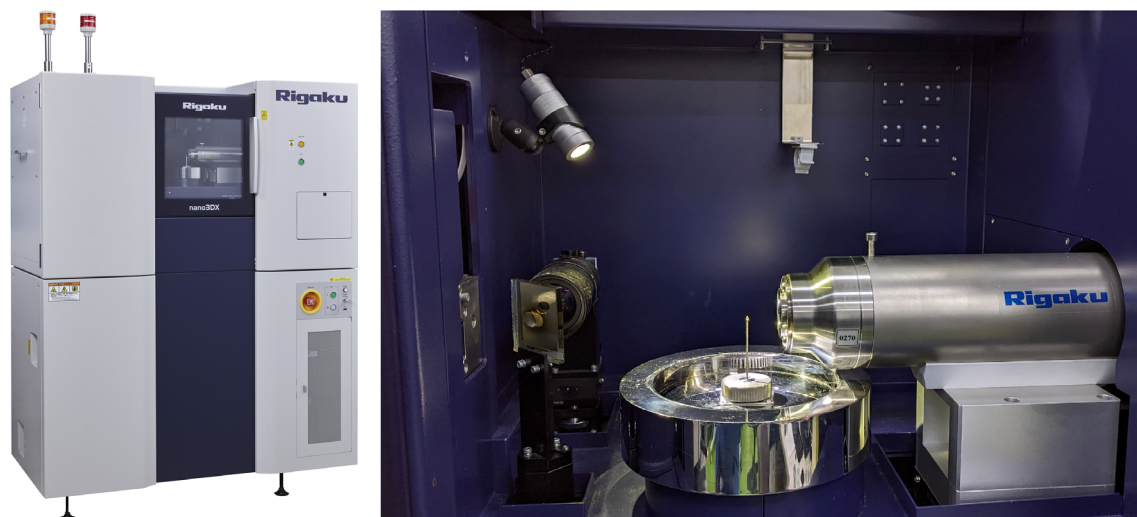


図1. 実験室ベースX線顕微鏡nano3DX. 装置全景(左), および試料ステージ部(右).

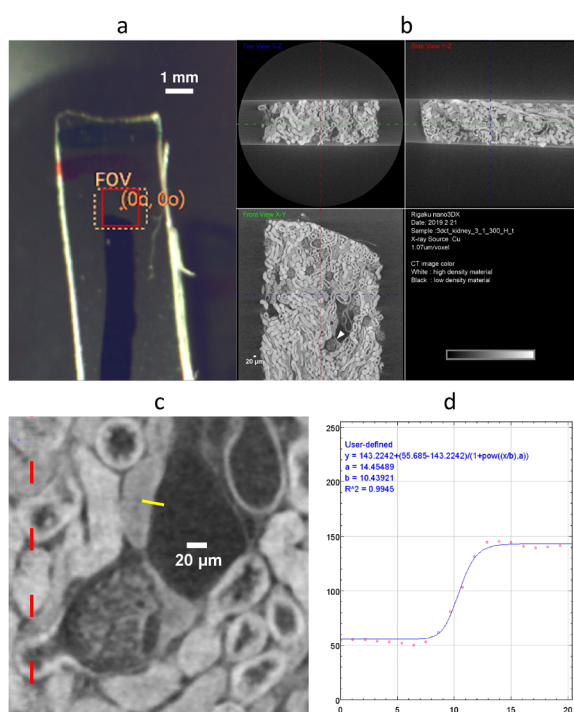


図2. nano3DXによるマウス腎臓試料の観察. 文献5より引用. 実験セットアップ(a), 3方向からの直交CTスライス(b), 直交CTスライスにおいて矢尻で示す腎小体付近のCTスライス部分拡大(c), および部分拡大CTスライスにおける黄色線(約20 μm)に沿った輝度プロファイル(横軸は長さ, 縦軸は256階調の輝度値)による空間分解能評価(d). (a-c)はnano3DX付属ソフトウェア, (d)はプログラムImageJを使用して作成した.

3. nano3DXによるマウス腎臓試料の観察

我々は, 実験室ベースX線顕微鏡の生体アプリケーションの一例として, X線CTによる腎臓の微細構造観察⁽⁵⁾を試みた. 観察の概要を図2に示す. nano3DXの観察試料は, マウス腎臓試料を幅1 mm, 厚さ0.3 mmに切片化し, 重元素試薬として電子顕微鏡観察で一般的に用いられる四酸化オスミウム(OsO_4)を用いて染色した後, 同じく電子顕微鏡観察用のエポン樹脂を用い

てシート状に包埋して調製した(図2a). 800フレームから成る投影像データの撮影は, CuターゲットのX線を用い, 画素サイズ1.1 μm , フレームあたり20秒の露光で行った. 視野の幅は1.3 mmであり, 試料の幅をカバーする. X線透過率は72%であった. CT再構成の結果, マウス腎臓の微細構造がOs染色の造影効果により高コントラストで可視化された(図2b, c). 組織と樹脂の境界面に垂直な直線に沿った輝度プロファイルのボケ幅は1.6 μm と計測され, 画素サイズに起因する限界に近い空間分解能が得られたといえる(図2d).

4. 単一ネフロン立体表示

腎臓の機能単位はネフロンと呼ばれ, 血液から原尿をつくる腎小体と原尿から尿をつくる尿細管で構成されている. マウスの単一ネフロンに含まれる尿細管は, 一つの腎小体を源とし, 集合管まで10 mm以上にわたってひとつながりになっている. 図2cに示すCTスライス拡大図において左下方に黒く丸く見えるのが腎小体で, その周りを複雑に屈曲して取り囲んでいるのが尿細管である. 今回の観察では鮮明なCT画像が得られたので, 我々は単一ネフロン画像の抽出を試みた. まず, 画像解析ソフトImageJを用い, 各CTスライスにおいて腎小体およびそれに属する尿細管の領域を同定し(図4a), その領域を指定するマスク(図4b)を手動で作成し, そのマスクと元のCTスライスを掛け合わせることで単一ネフロンのみを含むCTスライス(図4c)を作成した. そのCTスライスを立体表示ソフトDrishtiにより統合した結果, マウス腎臓の単一ネフロンが立体的に可視化された(図3). この単一ネフロンは, 腎小体(RC; Renal corpuscle)を起点とする近位尿細管(PT; Proximal tubule)から図中の点線で示す中断部を経て腎小体に戻る遠位尿細管(DT; Distal tubule)と終端の集合管(CD; Collecting duct)までを含み(図3b), さらに, 太い動脈から腎小体に入ってい

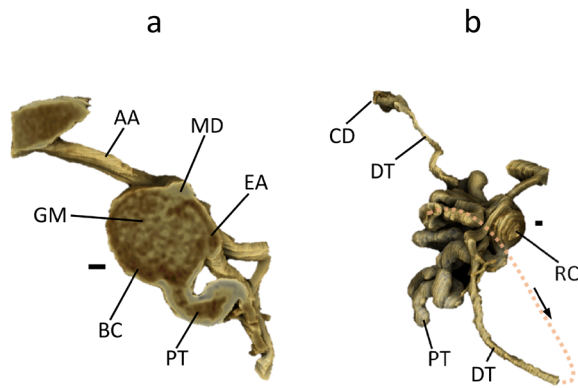


図3. マウス腎臓の単一ネフロン立体表示. 文献5より引用. プログラム *Drishhti* を使用して作成した. 腎小体の断面図(a)およびネフロン全体像(b). スケールバー: 20 μ m. 各部位の名称は本文に記載した.

る輸入動脈(AA; Afferent arteriole), 微細血管の集合体である糸球体(GM; Glomerulus)を経て腎小体から出てすぐ枝分かれする輸出動脈(EA; Efferent arteriole)から成る血管系を含む(図3a). また, 糸球体の血管極側には遠位尿細管とコミュニケーションするマクラデンサ(MD; Macula densa), 尿細管極側には原尿を集めるボーマン嚢(BC; Bowman's capsule)と呼ばれる部位が見られる(図3a). これらの構造は, これまでに研究されているマウスネフロンの知見と一致しているが, 立体的に詳細に可視化された点が異なる. モデルに含まれる尿細管の長さは4 mmと計測された. したがって, 全長の40%以下がモデルされたことになる.

5. 尿細管の画像分析

次に我々は, 実験室ベースX線顕微鏡により得られたマウス腎臓のミクロンレベルのCT画像に基づき, 画像分析による特徴抽出を試みた(図4). 尿細管には腎小体からはじまって上流に位置する近位尿細管(PT)と下流に位置する遠位尿細管(DT)がある. この近位と遠位尿細管を観察したところ, 両者のCT輝度値に差があるように見えた. そこで我々は, 尿細管全体のCTスライス(図4d, g)とそこから単一ネフロンに属する近位(図4e, h)および遠位尿細管(図4f, i)を切り出したものの3通りでCT輝度値ヒストグラム(横軸が輝度値)を比較した. 図4d-iでは輝度値をカラースケールで表示してある. また, 輝度値ヒストグラムでは, ピークの相対位置がわかりやすいように, 尿細管全体のヒストグラムを灰色で重ねてある. その結果, ヒストグラムの輝度ピーク位置は, 近位および遠位尿細管の間で異なっていた. そこで, 独立した5個のネフロンのCT画像についてさらに詳細な統計解析を行った結果, 重元素染色した近位および遠位尿細管が輝度値により区別できる(平均輝度値に有意差がある)ことが示された(表1). CNRはContrast-to-noise ratioの略であり, CTスライスにおける5ピクセル四方の比較

表1. CT輝度値の統計解析. 文献5より引用.

Air-PT CNR	Air-DT CNR	<i>p</i> -Value
45.2 $\pm$ 2.3	32.1 $\pm$ 2.0	3.4 $\times 10^{-5}$

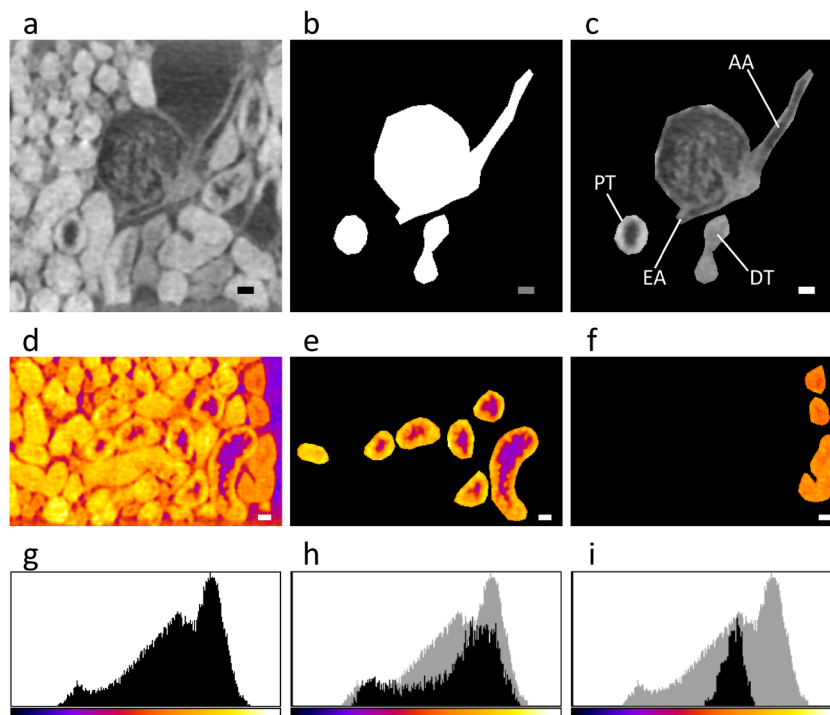


図4. マウス腎臓の尿細管の画像分析. 文献5より引用. プログラム *ImageJ* を使用した. スケールバー: 20 μ m. 腎小体付近のCTスライス(a), そのうち単一ネフロン領域を指定するマスク(b), および同マスクを使って抽出した単一ネフロン領域(c). 各部位の略号は図4と共通. CTスライス(d-f)およびそれぞれに対応する輝度値ヒストグラム(g-i)の比較による尿細管の画像分析. 詳細は本文参照.

対象2領域の間の平均CT輝度値の差の、差の標準偏差に対する比の値で定義される。Air-PT CNRは空気と近位尿細管皮質、Air-DT CNRは空気と遠位尿細管皮質のペア領域で計測した平均CT輝度値からそれぞれ算出したCNRである。これらのCNRを5個の独立したネフロンにおいて算出し、平均値 $\pm$ 95%信頼範囲として表中に示した。また、Air-PT CNRとAir-DT CNRの平均値の差についてStudent's *t*-testにより評価し、その結果の*p*-Valueを示した。今回腎臓試料の染色に用いたオスミウム試薬は不飽和結合を含む脂肪酸などに親和性が高いことが知られており⁽¹¹⁾、近位・遠位尿細管のオスミウム試薬に対する親和性の違いによりCT輝度値の差が生じたのかもしれない。

6. おわりに

今回X線顕微鏡を使って観察したマウス腎臓切片は、腎生検に用いられる一般的なバイオプシー試料を模倣して試作したものである。同顕微鏡の非破壊性を生かし、X線観察後の試料を電子顕微鏡でさらに詳細に観察することも可能である。したがって、本方法を発展させることで、腎生検の病理診断の高度化につながる可能性があり、実験室ベースX線顕微鏡の今後の展開として、医療診断や構造生物学における活用が期待される。リガクでは医療応用を中心としたnano3DXの生体アプリケーションの開拓を進めている。また、X線顕微鏡・光学顕微鏡・電子顕微鏡の相補利用によ

るシームレスな生体試料観察の実現を目指し、細胞内小器官を観察できるレベルの実験室向けの超高分解能X線顕微鏡の開発を進めている。組織から細胞内小器官に至る階層構造のシームレスな観察は現代生物学のボトルネックであり、その重要性は極めて高い。

参考文献

- (1) リガクジャーナル, **43** (2012), No. 2, 28–30.
- (2) 武田佳彦: リガクジャーナル, **50** (2019), No. 1, 30–33.
- (3) N. Kunishima, Y. Takeda, R. Hirose, D. Kalasová, J. Šalplachta and K. Omote: *Plant Methods*, **16** (2020) 7.
- (4) N. Kunishima, R. Hirose, Y. Takeda, K. Ito, K. Furuchi and K. Omote: *Sci. Rep.*, **12** (2022) 9436.
- (5) N. Kunishima, Y. Takeda, R. Hirose, S. Kume, M. Maeda, A. Oguchi, M. Yanagita, H. Shibuya, M. Tamura, Y. Kataoka, Y. Murakawa, K. Ito and K. Omote: *Microscopy*, **71** (2022) 315–323.
- (6) 武田佳彦, 濱田賢作: リガクジャーナル, **45** (2014), No. 2, 7–12.
- (7) 国島直樹: リガクジャーナル, **50** (2019), No. 2, 17–20.
- (8) 国島直樹: メディカル・サイエンス・ダイジェスト, **48** (2022), No. 14, 26–29.
- (9) D. Paganin, S. C. Mayo, T. E. Gureyev, P. R. Miller and S. W. Wilkins: *J. Microscopy*, **206** (2002) 33–40.
- (10) D. Kalasová, T. Zikmund, L. Pina, Y. Takeda, M. Horváth, K. Omote and J. Kaiser: *IEEE Trans. Instr. Meas.*, **69** (2020) 1170–1178.
- (11) J. A. Kiernan: *J. Histotechnol.*, **30** (2007) 87–106.