

論文内容要旨

Three-dimensional electron microscopy for endothelial glycocalyx observation using Alcian blue with silver enhancement
(アルシアンブルー銀増感法を用いた血管内皮グリコカリックス観察のための三次元的電子顕微鏡法)

Medical Molecular Morphology

病理系臨床病理診断学 向井俊平

Glycocalyx (GCX) は血管内皮などの細胞表面を覆う糖蛋白質の薄層で、様々な生物学的プロセスに関与している。従来から GCX が陰性に荷電している性質を利用して Lanthanum や Alcian blue (ALB) などの陽性荷電物質を付着させて電子顕微鏡で観察する方法が報告されている。本研究では、ALB と銀の相互反応に注目し、血管内皮 GCX をホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片を用いて 3 次元的可視化する簡便な方法を検討した。【方法】1% ALB を含有する 10% 中性緩衝ホルマリン固定液でマウスを灌流固定もしくは浸漬固定し、摘出した腎臓の FFPE 標本を薄切、脱パラし試料を作成した。それらを光学顕微鏡 (LM)、透過型電子顕微鏡 (TEM) および低真空走査型電子顕微鏡 (LVSEM) で観察した。【結果】灌流・浸漬いずれの固定試料においても、LM ではさまざまな血管レベルで GCX が青く染色され、TEM では内皮を覆う薄層として確認された。LVSEM では、無染色の切片では GCX を確認できないが、PAM 染色を行うと ALB に付着する銀粒子として GCX を可視化できた。さらに光顕像と走査電顕像を連関させる CLEM 法 (Correlative Light and Electron Microscopy) により、3 次元的に GCX を描出することができた。【結論】ALB と FFPE 切片を用いて LVSEM で 3 次元電子顕微鏡的に観察する、簡便な血管内皮 GCX 描出法を確立した。将来的には血管内皮傷害を引き起こす疾患の GCX の評価などの臨床応用が期待される。