

病気前診断のための電子顕微鏡サンプルホルダの開発

新谷 正嶺

「まだ後戻りが可能」な超早期・前駆状態を捉え、対処することで、健康な状態に引き戻す「病気前診断」は未だ確立されていない。この病気前診断を実現するためには、既存の診断手法より鋭敏に生体情報を計測する方法と、その計測データから病気前状態を検出する分析手法の開発が必要であると考えられる。我々は、基本的に乾燥固定した試料の静止像しか計測出来ないが、光学顕微鏡より分解能が約 400 倍高く、焦点深度が約 60 倍深い、走査型電子顕微鏡で、液中試料の構造と「動き」を観察出来るようにすることで、同じ採血や生検による生体試料から、現状よりも詳細な生体情報の計測が可能になると考え、その実現に挑戦した。そして、変形性と電子線透過に優れた膜を作成して利用する方法で、この電子顕微鏡ライブイメージングの実現に成功した。

1. はじめに

生活習慣や高齢化に起因する慢性疾患(糖尿病、動脈硬化、神経障害など)は、治療が困難であり、重い疾患(脳梗塞、心不全、神経麻痺・壊疽)を発症する原因となる可能性が高い。そのため、これら慢性疾患やそれに起因する重い疾患を発症後に治療するのではなく、疾患の超早期状態や前駆状態を捉える「病気前診断」と、その超早期・前駆状態から疾患への移行を防ぐ「予防治療」を可能とすることが急務となっている。この病気前診断と予防治療の複合医療を実現させることが出来れば、健康寿命の延伸と人的・財政的医療負担の大幅削減を行えると見込まれる。

しかし、この「まだ後戻りが出来る」超早期・前駆状態を捉える「病気前診断」も、その状態を把握した後、健康な状態に引き戻す「予防治療」も、未だ確立されていない。現在正常と考えられている生体組織において、疾患の予兆を捉える「病気前診断」を実現するためには、未だ発症メカニズムが十分に解明されていない慢性疾患の発症メカニズムを解明し、その発症過程を鋭敏に察知できる計測手法を確立する必要がある。

「病気前診断」を実現させるための計測手法の確立には、大別して2つのアプローチがある。

一つは、簡易・非侵襲な計測手法の開発と利用である。「病気前」に行う検査であるならば、その検査は侵襲性の低い計測手法であることが望ましい。また、「病気前」に行う検査であるならば、簡易な方法であることが望ましい。しかし、簡易で非侵襲な計測は、計測対象が臓器レベル以上のマクロな生体ダイナミクスとなる場合が多く、様々な生体内素過程が関わるため、意味が明快な解析が難しいという難点がある。

もう一つの方法は、簡易・低侵襲で、高精細な計測手法の開発と利用である。現状と同様の採血や生検で採取した試料に対して、現状よりもずっと高精細な情報を取得できる新規計測方法が開発できれば、現状以上に、より早期に、より明確に病気を捉えることが可能になると期待される。特に、「まだ後戻りが出来る」超早期・前駆状態を明確に捉えられる可能性が高い。

我々は、「病気前診断」を実現させるためのこの2つの手段双方への検討を進めている。その結果、前者の簡易・非侵襲計測による診断も、深層学習型の人工知能技術を用いた分類を行うことで、例えば、超音波探触子による2秒間の心音データから、2カ月齢正常マウス

(C57BL/6JmsSlc)、3カ月齢2型糖尿病モデルマウス(C57BL/6JHamSlc-ob/ob)、2型糖尿病モデルマウス(C57BLKS/J Iar+Lepr^{db}/+Lepr^{db})、正常マウスに2カ月間高脂肪食を投与して飼育した3カ月齢マウスを99.2%の精度で識別できることを確認した(図1)。「病気前診断」の実現のためには、この例のような、非侵襲計測と人工知能技術を活用した解析の複合手法も発展性の高い手法となると考えられる。

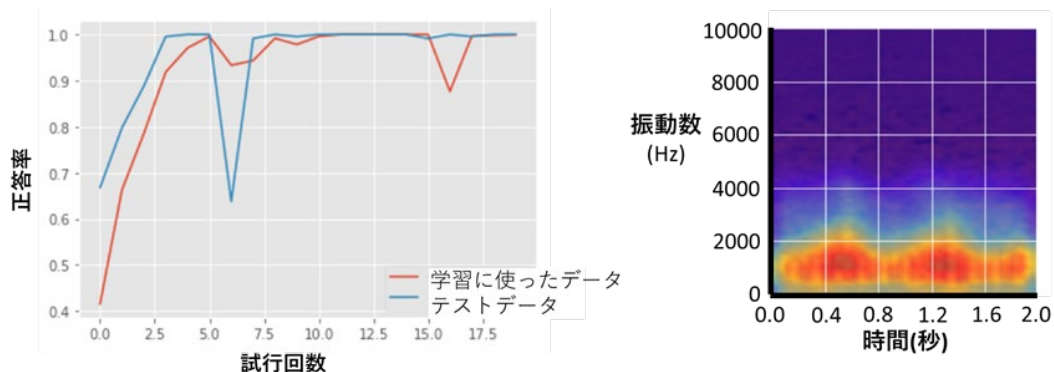


図1. 心音データに基づくマウス識別アルゴリズムの学習に伴う正答率推移(左図)と、その学習済み識別アルゴリズムが心音データの識別をする際に着目していた領域のヒートマップ表示で強調した、心音のメルスペクトログラム画像データ(右図)。

また、現状と同様の採血や生検で採取した試料に対して、より高精細な情報を取得する方法として、ラマン分光顕微鏡法で計測されたラマン分光スペクトルに基づいた、若齢の正常マウスと2型糖尿病モデルマウスの比較解析を行った。ラマン分光スペクトルは、血液中の様々な分子結合に由来するシグナルを含んでいるため、分子レベルの結合の割合の変化を捉えることが出来る。その結果、主成分分析およびUMAPによって2次元に次元圧縮した状態空間における位置として、正常マウスと2型糖尿病モデルマウスが区別出来ることが分かった(図2)。次元圧縮の操作には正常・病態のラベルは影響しないため、この結果はラマン分光スペクトルから、正常マウスと2型糖尿病モデルマウスの区別が可能であることを示している。このような予備実験成果の獲得に成功した。

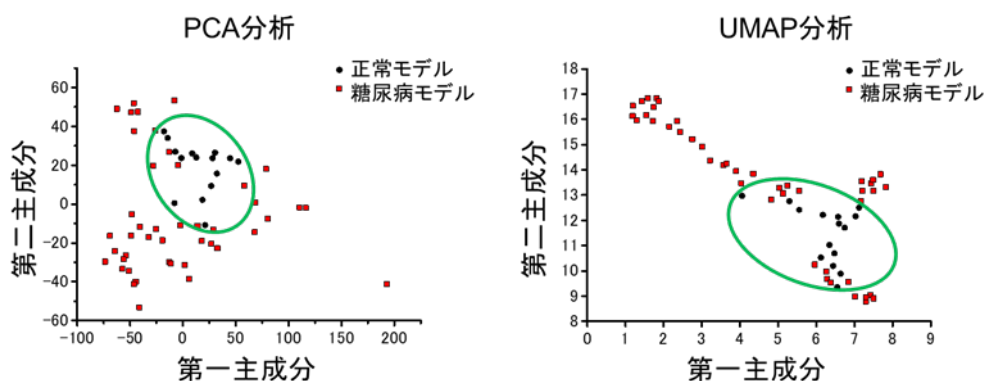


図2. 正常・病態マウスから採取した血液のラマン分光スペクトルの情報を主成分分析(PCA)で2次元に次元圧縮した結果(左図)と、圧縮手法を非線形の次元圧縮手法の一つであるUMAPにした場合の結果(右図)。

このような「病気前診断」実現に向けた基礎研究的成果の獲得には成功している。これら成果に関する研究を発展させることで、高精度な「病気前診断」判定は行えるようになると期待できる。特に、人工知能技術を利用して、様々な情報を複合して診断を行う方法を採用することで、「病気前診断」の精度向上を望めると予想できる。

しかし、何故、どのように疾患に至るのか、今からどのような対処を行えば良いのか、「予防治療」を実現するには、現状と同様の採血や生検で採取した試料に対して、現状よりもずっと高精細な情報を取得できる新規計測方法の開発が望まれる。

そこで我々は、採取した血液や生体組織試料を、濡れたそのままの状態ですべて走査型電子顕微鏡観察し、その構造と動きの計測が出来る新たな計測手法、電子顕微鏡ライブイメージング法の実現に挑戦した。

2. 実験結果

手法の詳細は本報告書では割愛するが、我々は、電子線透過性と変形性に優れた薄膜を作成し、この薄膜と試料ホルダで約 0.01 Pa 真空の試料室の中に、溶液に浸かった試料を溶液ごと保持できる密閉空間を作り出した(図 3)。そして、観察試料の溶液に浸かったままの構造と動きを計測することに成功した(図 4)¹⁻³⁾。ここでは、培地に浸かったマウス摘出心臓の断面構造と、赤血球の観察像を示す(図 4)。我々は、この新しい、液中試料の構造と動きを走査型電子顕微鏡で観察出来る手法を、変形性と電子線透過性に優れた膜を使った計測方法であることから、DET 膜(Deformable and Electron Transmissive Film)法と命名した。

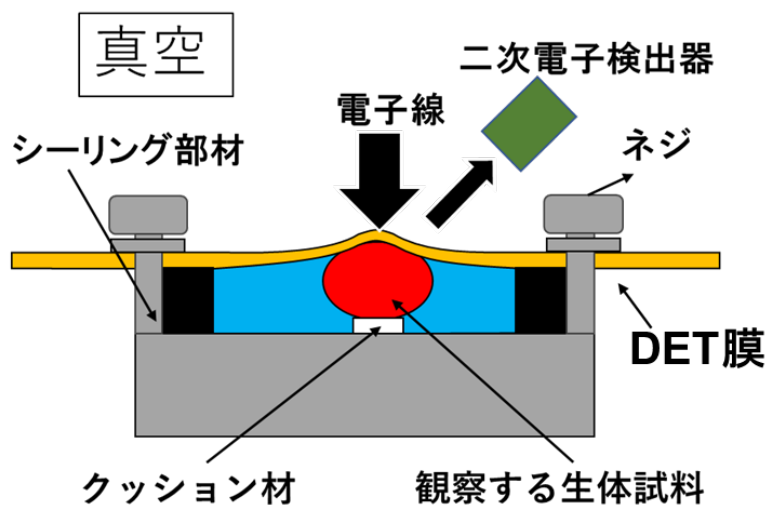
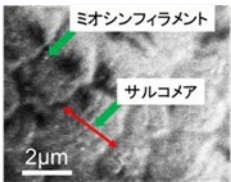
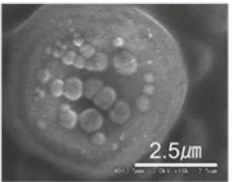


図3. 電子顕微鏡ライブイメージング法(DET膜法)の原理を説明した模式図。DET膜法を可能にする試料ホルダの概要

溶液中で動く心臓の電子顕微鏡ライブイメージング法の開発



心臓断面



赤血球

- ・溶液下の観察が可能
- ・高い計測分解能
- ・試料の動きも計測可能

⇒生理的分子計測の実現

図4. 筆者が開発した電子顕微鏡ライブイメージング法(DET膜法)

3. おわりに

本報告書で紹介した通り、今後の医療は、完治が不可能な重い疾患に罹ってから、対処するのではなく、疾患の超早期状態や前駆状態を捉える「病気前診断」と、その超早期・前駆状態から疾患への移行を防ぐ「予防治療」の実現による先制医療を目指して発展していくと見込まれる。そしてこの先制医療の発展が人々の健康寿命を延伸し、医療費負担や老後の生活の質を向上させると期待される。本報告書で紹介した、私が開発した電子顕微鏡ライブイメージング法(DET膜法)は、この「病気前診断」や「予防治療」のための研究や、実際の検査で有効に使える可能性が高い(図5)。

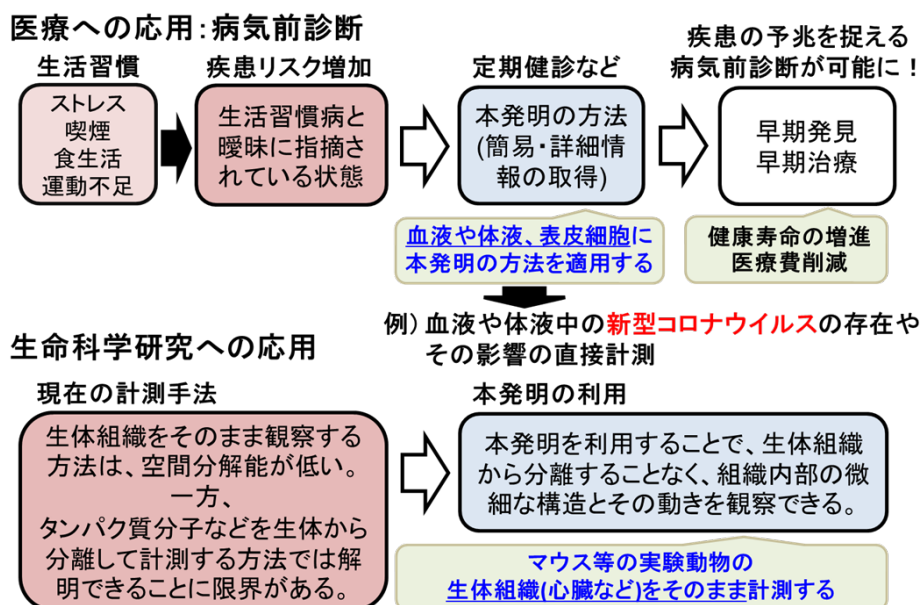


図5. 電子顕微鏡ライブイメージング法(DET膜法)の医療及び生命科学研究への応用例

現在、我々は、この新しい電子顕微鏡ライブイメージング法、DET膜法の高性能化と安全な使用条件の確立を目指して研究を進めている。来年度の報告書では手法やより詳細な解析結果についても報告したい。

最後に、工作デザインルームの皆様に感謝の意を表す。本DET膜法を実現する試料ホルダは工作デザインルームのマシニングセンタを利用して作成した。工作デザインルームによる、ものづくり支援の環境に深く感謝し、今後も活用させていただきたいと考えている。

参考文献

- 1) Seine A. Shintani: Mechanical properties of cardiomyocyte sarcomeric oscillations captured by sarcomere length nanometry and electron microscope live imaging, The 59th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Online Conference. (2021).
- 2) Seine A. Shintani: Autonomous oscillation characteristics of the heart measured by the new electron microscope live imaging method, The 99th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Miyagi, Japan, (2021).
- 3) 新谷正嶺: 電子顕微鏡ライブイメージング法による心臓の構造と動きの計測, 日本顕微鏡学会第77回学術講演会, 茨城, 日本, (2021).