

WS3-6

位相差電子顕微鏡の厚い樹脂切片における組織化学への適用

中沢綾美¹⁾、厚沢季美江²⁾、臼田信光¹⁾、永山國昭³⁾

¹⁾ 藤田保健衛生大学 医学部 解剖学 II

²⁾ 名古屋大学環境医学研究所

³⁾ 自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター・生理学研究

【目的】電顕組織化学は、化学反応の産物を何らかの方法で重金属を用いて人工的に電子密度が高くなるようにして、その物質の組織・細胞における局在を知る研究方法である。通常電顕を用いた観察において、構造自体を観察するために、重金属による電子染色が必須である。つまり、重金属に依存して反応産物と構造の可視化を行っている。そのため、局在性がしばしば視認されづらい。一方、位相差電顕は電子波の位相のずれを観察する。様々な生物試料を位相差電顕を用いて観察した結果、位相差電顕には通常電顕にはない特徴があることがわかった。培養細胞の氷包埋標本は、厚さが1 μm 以上の厚い標本であるが、重金属を全く使用しなくとも細胞内小器官・細胞骨格の超微構造が観察可能である。樹脂切片においては、固定にオスミウムを使用して有れば、電子染色を行わなくとも高コントラストな観察が可能である。オスミウムを反応産物とする組織化学を施した標本の厚い樹脂切片を作成して、細胞内小器官、ペルオキシソームとゴルジ装置の観察に位相差電顕を用いた例を供覧したい。

【材料と方法】ラット肝臓組織をカコジル酸で緩衝した2.5%グルタルアルデヒドで固定した後に染色を行った。ペルオキシソームの染色：組織小片をアルカリDAB反応液中で60分間反応ののちに1%四酸化オスミウムで後固定しエタノール脱水の後にエポキシ樹脂に包埋した。ゴルジ装置の染色：亜鉛・ヨード・四酸化オスミウムから調整したZ10液に48時間浸漬し、エタノール脱水の後にエポキシ樹脂に包埋した。それぞれより、0.1 μm の超薄切片から1 μm の厚い樹脂切片を作成した。電子染色を行わずに、通常観察法、Zernike 位相差法、Hilbert 微分法により観察した。

【結果と考察】DAB 反応を施した肝細胞では、小円形状の細胞小器官であるペルオキシソームが、Z10 染色を施した肝細胞では、層板状の細胞小器官であるゴルジ装置が観察された。0.1 μm の切片で通常観察法を行うと細胞小器官の形態は明瞭であるが、切片が厚くなるにつれ不明瞭に成った。一方、Zernike 位相差法と Hilbert 微分法では、切片が厚くなっても形態は明瞭で、形質膜をはっきり観察された。位相差電子顕微鏡観察法においては、通常電顕観察法より厚い切片の観察が容易であることが判明した。

WS3-7

位相差電子顕微鏡に適した生物試料作製法 - 凍結超薄切片の位相差電子顕微鏡観察

新田浩二、花市敬正

自然科学研究機構、花市電子顕微鏡技術研究所

【目的】近年開発された位相差電子顕微鏡は無固定、無染色の生物試料の高コントラスト観察を可能にした。このことは、より生体に近い状態(いわゆる生)の観察が可能になると同時に、細胞形態とともに分子形態の新しい知見が期待できる。通常、電子顕微鏡観察の試料作製には、細胞の持つ水の処理や構造のコントラストを補うことを目的として固定、脱水、樹脂包埋、染色等多くの操作をおこなっている。この間に構造物質の流出や人工産物を導入する可能性があると考えられている。生物試料の位相差電子顕微鏡観察では、氷包埋した培養細胞やバクテリア等の単細胞、ウイルスのような微細な試料の無固定、無染色標本から新たな知見を得られているが、多細胞からなる厚い試料である生物組織への応用例はほとんど無かった。新鮮な生物組織を観察するには組織、細胞の持つ水を包埋剤として凍結し、超薄切片を作製する凍結超薄切片法が有効である。凍結超薄切片法はすでに電子顕微鏡の試料作製技法としてよく知られ、固定した組織の切片では免疫染色やネガティブ染色の高分解能観察、無固定組織の切片ではEDX 分析などがある。この技法の利点は物質の流出が少なく、固定の調節で抗原の保存も容易であることや氷晶障害以外の人工産物の導入が少ないこと、及び切片作製までが従来の超薄切片法に比べ短時間に行えることである。

本研究では凍結超薄切片法が位相差電子顕微鏡観察に適した生物試料作製法の一方法と考え、今回は固定したラット肝臓組織を用い高压凍結、凍結超薄切片作製、切片回収法の検討をおこなった。

【方法】氷晶防止処理(蔗糖)した試料及び処理しない試料をそれぞれ高压凍結し、凍結切片(処理試料:-120°C、処理しない試料:-150°Cで切削)を作製し、切片はカーボン支持膜を張った銅製グリッド(400メッシュ)2枚で挟み圧着して切変を支持膜に密着させた。切片を挟んだ2枚のグリッドはクライオトランスファーシステムを用いて、そのままヘリウムステージを備えたヒルベルト位相差電子顕微鏡観察を行った。

【結果】高压凍結法の適用により、蔗糖を用いない試料でも凍結切片作製が十分可能であった。位相差電子顕微鏡観察の結果、細胞内に氷晶と思われる像はなく、広範囲の切片観察が可能であり、部分的ではあったがいくつかの細胞小器官が確認できた。また、通常法では観察できなかった微細な起伏が切片上に多く観察され、微細構造観察が困難であることなど、新たな問題点も示された。高压凍結した生物組織の凍結切片は、本来位相差電子顕微鏡観察に適した試料作製法であるので、問題点を克服し、多細胞からなる組織試料であっても、生体に近い無固定・無染色の電子顕微鏡観察を可能としたい。