

P1-51

白金ブルーの TEM 試料への応用
— 酢酸ウラニルの代替染色剤として —

稲賀 すみれ¹, 勝本 哲央¹, 田中 敬一², 亀家 俊夫¹, 中根 裕信¹,
名黒 知徳¹

¹鳥取大学医学部機能形態統御学講座ゲノム形態学分野,

²田中SEM研究所

近年入手が困難となってきた酢酸ウラニルに代わる電子染色剤の一つとして、白金ブルーを用いた透過電顕 (TEM) 試料の簡便な染色法を開発した。白金ブルーとは、シスプラチンとチミジンの化合物 (白金錯体) で濃青色をした水溶液であり (Tanaka & Inagaki, 1993)、これまでは主に SEM 領域で反射電子シグナル増強剤として用いられてきたものである。この白金ブルーを、一般的な方法で作製した樹脂包埋超薄切片の電子染色およびネガティブ染色に応用したので、その方法と結果を紹介する。

【材料と方法】1) 樹脂包埋超薄切片: ラットの肝臓、腎臓および A 型インフルエンザウイルスを感染させた MDCK 細胞を 2.5%GA と 1%OsO₄ で二重固定。Epon 812 に包埋して超薄切片を作製。白金ブルー (室温 10 分) と鉛により二重染色。2) Post-embedding 免疫電顕: HeLa 細胞をプラスチックシート上に培養して 2% PFA+0.1% GA で固定。Lowicryl K4M に包埋 (-30°C、UV 照射)。超薄切片を作製して、免疫染色 (抗 Ki-67 抗体にナノ金標識) 後、白金ブルーと鉛により二重染色。3) ネガティブ染色: 浮遊培養した大腸菌 (DH5α 株) を遠沈し、未固定のまま少量の白金ブルー原液を加えて混合。これをカーボンコートした支持膜に載せ、余分の液を除き乾燥。それぞれの標本を TEM にて観察した。

【結果】超薄切片像では、白金ブルーと鉛の二重染色によって肝細胞や腎糸球体の細胞内微細構造がコントラスト良く観察できた。また、出芽ウイルス粒子内部に RNP 複合体の規則的に配置する構造 (Noda et al., 2006) が観察された。大腸菌のネガティブ染色像では、鞭毛が明瞭なコントラストで示された。これらの結果は、白金ブルーが酢酸ウラニルに代わる安全で有用な電子染色剤である事を示唆した。

P1-52

デジタル TEM の為の観察法
(3) 結合組織の電子染色

佐藤 茂, 安達 彰子, 佐佐木 喜広, Mohammad Ghazizadeh

日本医科大学中央電子顕微鏡研究施設

【はじめに】透過型電子顕微鏡 (二重染色) で結合組織を観察すると、弾性線維のエラスチンやコラーゲン線維が電子染色されない。その為に、タンニン酸やウーロン茶抽出物 (OTE) による結合組織染色がある。これらの染色は共に酢酸ウランを用いている。しかし、デジタル TEM は鉛の単染色で観察する事が望ましいとの結果を得た。そこで、ウランを使用しないで OTE と鉛による染色 (OTE 染色法) を試みた。

【対象および方法】材料は正常ラットの肝臓を用いた。試料作成は常法に従って固定、包埋し超薄切片とした。この切片を 0.2% OTE 溶液 (リン酸緩衝液) に 30 分、クエン酸鉛 3 分染色し、H-7500 透過型電子顕微鏡に取り付けたサイドマウント式の CCD カメラを用いて検鏡した。また、フィルムによるアナログ観察も行った。

【結果および考察】OTE 染色法により弾性線維のエラスチンが好染され、コラーゲン線維も増強染色された。このことから、ウランを用いなくても結合組織染色が出来ることが明確となった。

また、OTE 染色法を用いてアナログ観察を試みた。OTE 染色法はルーチンで用いられているウランと鉛の二重染色とほぼ同様なコントラストを得られた。酢酸ウランは放射性物質であり、国際規制物質として輸入や管理が厳しい。そのウランの代わりに安全性が高い OTE が電子染色に使えることの意味は大きい。

【結語】

- 1 OTE 染色法はデジタル TEM の為の結合組織染色に使える。
- 2 OTE はウランの代わりになり、通常の透過型電子顕微鏡観察の染色にも応用できることが分かった。