

生物試料における透過型電子顕微鏡試料作製法について

京都大学医学研究科附属総合解剖センター

幸田 晴康

はじめに

電子顕微鏡は 60 年程前にドイツの科学者ルスカによって発明され、その後めざましい発展を遂げた。高い分解能（2 点間が分離して観察される最短距離）をもち光学顕微鏡では見ることの出来ないウイルスや細胞膜までもが観察可能となった。しかし観察試料は真空中に曝され、電子線が透過する事や電子線にダメージを受けない事など制約を受ける。生物の組織、細胞は水分を多量に含んでいるのでそのままの状態を観察する事は不可能である。したがって、その条件を充たすため処理する行程が試料作製法であり、形態を自然のままの状態に保存する事が不可欠である。ここでは形態構造を観察する上でも重要な超薄切片法を中心にその概要を述べ、また日常業務で苦慮している極微量浮遊細胞包埋法について検討を加えて紹介する。

透過型電子顕微鏡について

光学顕微鏡では観察したい対象に可視光線を照射して拡大するのに対して、波長の短い電子線を真空中で試料に照射して、試料を透過した電子線を結像系で拡大させることにより、試料の微細構造を観察することができる電子顕微鏡を透過型電子顕微鏡という。原理的には光学顕微鏡と同じで、拡大率の高い電子レンズが使われており内部構造の観察に適している。

試料作製法

1) 固定

採取後の組織の変化（自己融解など）を最小限に抑え、出来る限り生きていた時に近い状態を保持し、細胞内の様々な成分を試料処理操作において流失しないようにする事である。微細構造観察において一般的な化学固定は、グルタルアルデヒド（前固定）と四酸化オスミウム（後固定）による二重固定である。

2) 脱水

生物試料から水分を取り除く操作である。一般的にエタノールが用いられ、徐々に濃度を高めた脱水系列に一定時間浸漬して進める。（50%～100%）

生物試料の試料作製法の手順

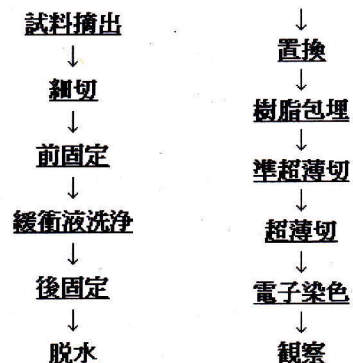


表 1

3) 置換

脱水剤と包埋剤との仲介を行う操作である。多少樹脂が混ざっても熱重合が出来る揮発性の高い酸化プロピレンが用いられる。

4) 樹脂包埋

固定・脱水した試料をプラスチック樹脂の中に埋め込み、試料に樹脂を浸透させ、試料を含めて樹脂を重合体にする操作である。樹脂を 60℃の恒温器に 2~3 日入れて重合硬化（熱重合）させる。

5) 準超薄切片の作製

超薄切片作製に先立って準超薄切片（0.5~1.0 μm）を作製する。準超薄切片を用いて光顕観察を行うことは、試料の目的部位の確認や組織標本の光顕所見との対応を求めるとともに試料作製（固定~包埋）の判定をする上でも重要である。光顕観察を行う為の染色は、一般的にトルイジン青染色が用いられている。

6) 超薄切片の作製

組織や細胞内の微細構造を観察するには、その試料を電子線が透過可能な厚さにしなければならない。そのため、通常観察では薄片の厚さは 60~80nm が適当であり、水面に浮かんだ干渉色により判定する。（図2）そして、その切片をグリットに軽く押しつけ接着させて回収する。（図3）又超薄切する部屋の環境条件として温度、湿度、振動、空気流、輻射熱など十分な配慮が必要である。

7) 電子染色

超薄切片はコントラストが低く、像として観察するのは困難である。そこで、細胞の構成成分と親和性がある重金属塩を沈着させることにより試料の電子密度を上げ細胞の微細構造のコントラストをあげる。一般的には、酢酸ウラニル染色（核質や RNA 顆粒が染まる）と鉛染色（グリコーゲン顆粒や膜構造が染まる）の二重染色を行っている。

8) 透過型電子顕微鏡で観察（図1）

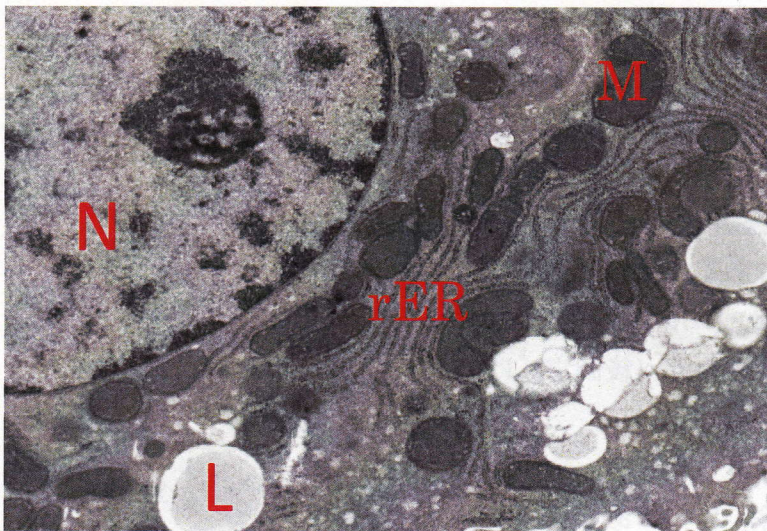


図1 ラット肝細胞の電顕像

*N=核 M=ミトコンドリア rER=粗面小胞体 L=脂肪滴

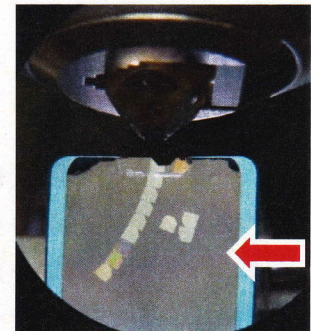


図2

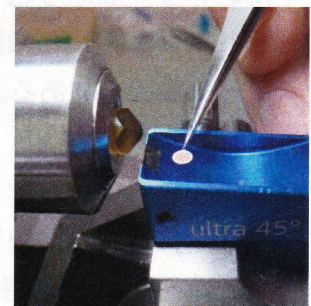


図3

まとめ

透過型電子顕微鏡を用いた生物試料の標本作製において、超薄切片法は電子顕微鏡観察法の中で基礎的な技術である。しかし、この技術の習得には経験に基づく知識や技能が要求され、良質な超薄切片（60～80 nm）を得るには、その試料作製法が最も重要である。特に固定から観察まで様々な処理をされる過程で、試料に施された特性をふまえて試料作製を行う必要がある。

<極微量浮遊細胞包埋法の検討>

はじめに

電子顕微鏡室では実験動物の組織、培養細胞など多種多様な試料を扱っている。その中で、極微量の組織や浮遊系培養細胞などの試料作製には処理過程で常々苦慮している。そこで今回我々は、近年パラフィン組織標本作製で用いられている iPGell 法という細胞をゼリー状に固める方法を電子顕微鏡の試料作製にも応用する事が可能であるか検討した。

材料と方法

2%グルタルアルデヒド（前固定液）で固定した極微量の試料に、従来用いられている寒天包埋法と iPGell 包埋法を施した。その後、四酸化オスミウム（後固定）以後の試料作製を行い電子顕微鏡観察を行った。

結果

1. iPGell 包埋法で試料作製を行った場合は、1分間（室温）で試料を固める事ができた。（図4）
2. iPGell 包埋法は非加熱の試薬であり、試料作製が容易であった。
3. iPGell 包埋法は固定後の試料でも包埋可能であった。
4. 電顕像を比較しても iPGell 包埋法と寒天包埋法の差は認められなかった。（図5）

	寒天包埋法	iPGell 法
固まる時間	30分（-4℃）	1分（20℃）
試薬の温度	加熱（40～50℃）	非加熱
操作内容	煩雑	簡便
固定後の試料	包埋可能	包埋可能
電子顕微鏡試料作製	適応	適応

表2 寒天包埋法と iPGell 法の比較

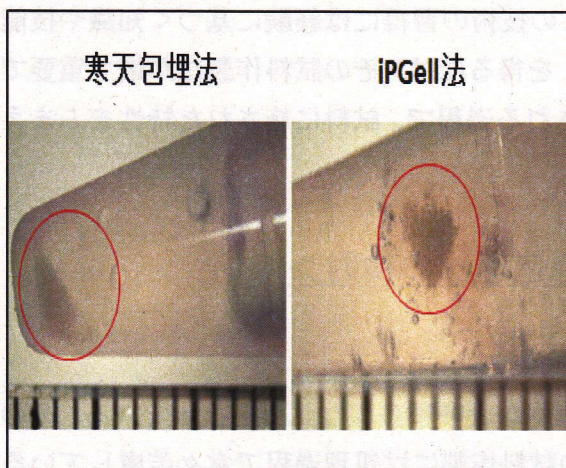


図 4

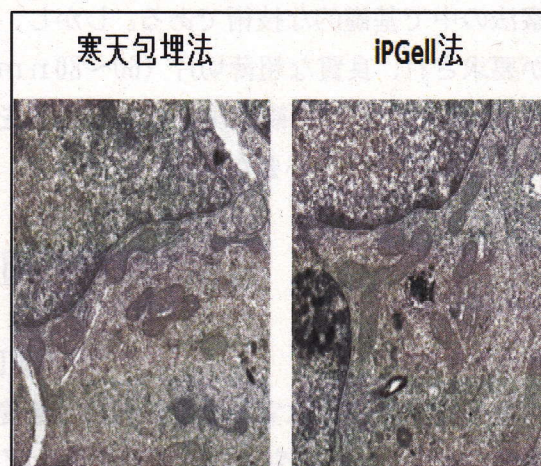


図 5

考 察

前固定（グルタルアルデヒド）後の極微量浮遊細胞に iPGell 法を試みたところ、寒天包埋法に比べて迅速で、非加熱で細胞魂を固める事ができ、操作も簡便であった。この事より iPGell 法が、電子顕微鏡試料作製に活用ができ有用であると思われる。

参考文献

1. よくわかる電子顕微鏡技術：朝倉書店, 1966.
2. 現場で役立つ電子顕微鏡試料作製法：金芳堂, 1999.
3. 超薄切片の実際：西村書店, 2011.
4. 電顕入門ガイドブック：国際文献印刷社, 2011.
5. よくわかる立体組織学：学祭企画, 1999.

感想 『生物試料における透過型電子顕微鏡の試料作成法について』

幸田 晴康技術専門職員

- ・ 普段あまり接することがないと思われる技術について講義していただきました。
- ・ TEM 試料における生物試料の作製手順や技術的に習得が難しい箇所を紹介していただきました。難しいと言われるとぜひ挑戦してみたくなりました。
- ・ 普段の業務からは全く関わりの無い業務という事で興味深い講義であった。
ルーチンワークが多く、日々の仕事を正確にこなすという事だけでなく、新しい方法の検討を行い実際に実用に耐える方法を確立する等、多いに刺激を受けた。
- ・ 顕微鏡用の試料作成は、まさに職人技であると感じました。技術職員の仕事は本当に様々であると今回の研修全体を通して改めて思います。
- ・ 業務でセラミックスなどの電子顕微鏡用の試料を作製しておりますが、分野が異なり試料が異なればこれほど手法、作製機器が異なるのかと非常に勉強になりました。また、電子顕微鏡用試料を作製している一方で電子顕微鏡自体は取り扱わないため、電子顕微鏡の種類や原理、拡大された写真は新鮮で面白かったです。
- ・ 解剖センターの方のお話だったため、死後の細胞をより生体に近い状態で観察しなければならず、試料作成に1週間から10日ほどかかると伺い、びっくりした。結果を待つ側はより速く結果が知りたいことだろうが、これほどまでに資料の作成に時間がかかっているのだとは全く知らなかった。切片を作成するのに大変細かな作業をされており、自分には無理だなと痛感した。
- ・ 分野的に一番理解が難しいと思っていたが、話を聞いてみると少しは理解できる場所もあった。要するに自分達の業務と共通することは、「経験に基づく知識や技術が必要」ということで、まさに先輩から受け継いだものを後輩へ伝承していかなくてはならない、技術職員の特命だと思った。
- ・ 電子顕微鏡の試料作成は非常に専門性の高い技術であり、身に着けるまでに大変な時間と労力を費やされたことと思う。また自分のまつげや馬の尾の毛などで自分専用の仕事道具を作るなど、独自の創意工夫もされていることが分かり、感銘を受けた。
- ・ 非常に困難である生物試料の作成についてのお話を伺った。大変繊細な作業であり、高い技術に敬服した。
- ・ 先日、研修にて実物を見学させてもらったが、改めて試料作りの難しさ、大変さを講義から知ることができた。いくつもの工程を経て、やっと観察できるサンプルができるのに多くの時間と、匠の技が必要なことが驚きである。
- ・ 職人芸の大切さとそれを身につける大変さを感じました。
- ・ 正に技術職員の仕事である点が紹介され、このような技術が他の技術職員にも伝えられるようになればよいと思いました。
- ・ 技術習得に難しかった点など、具体的に説明されていた。

もともと、病理切片を作製していた演者が、技術習得に数年かかったという事からも高度な技術であることが理解できた。

また、最後に説明のあった技術開発は綺麗な結果だったと思います。総長杯優勝おめでとうございます。

- ・情報系の技術とは異なる職人技が要求されるという点が非常に興味を持ちました。
- ・他部局の技能について知ることができた。技能の継承について説明がなかったことが残念であった。
- ・第4専門群研修で、見学はさせて頂いていたので、より内容を手に取るように理解する事が出来ました。そして、長時間掛けてより良い生物試料の透過型電子顕微鏡の試料作成法について、劣化し易い生物試料をきちんと電子顕微鏡で観測する事は難しく、長年培った技術の重要性を実感しました。更に、今では珍しい暗室が残る施設があるのに対し、新たな3次元組織画像作成可能な最新の電子顕微鏡導入等、長い年月をかけて弛まぬ新技術導入の時代を見越し、先取りをする姿勢には、目を見張る物がありました。技術職員として、求められるあらゆる要求にたいして、出来る限り答える事が出来る技術力の向上と最新装置の導入を日々、目指します。
- ・電子顕微鏡で観察するだけでなく、試料の切り出し・超薄切片の切り離しが難しいことについて、理解することができました。
- ・たまたま今年の第4専門群の研修が総合解剖センターで行われており、その際にこの透過型電子顕微鏡試料の作成法について超薄切片の作成について実際に装置が動いている状態で見ることが出来ていたので、今回の話はそのおさらいとなり非常に有意義であった。また、極微量浮遊細胞包埋法についても、前回話を聞いていたものであったので、これも有意義であった。
- ・透過型電子顕微鏡と走査型電子顕微鏡の区別が大変分かりやすく説明されていて理解しやすかった。前者は見たい物質の内部を、後者は表面を観察するための装置で、これら用途の違いで顕微鏡の外観も違ってくるというのが写真を見てよく理解できた。透過型電子顕微鏡は電子線をサンプルに透過（貫通）させる必要があるために上下に伸びた外観をしており、一方、走査型顕微鏡は斜め横から電子ビームを照射して回折してきた二次電子を検出するために横に伸びたような形をしていた。時々、これら両顕微鏡の話が業務で出てくることがあったが両者の違いが今ひとつよく分からないままだった。しかし、今回この講義に参加してその違いが理解できたので良かったと思った。
- ・繊細な作業であることがわかった。
 - ・私も電子顕微鏡を扱うことが主たる業務（ただし材料試料）あるため、興味深かった。生物試料のTEM試料作製でどこがどう難しいかという話などは他ではあまり聞くことができないもので参考になった。
- ・試料作製の各作業工程に、熟練の精密さが求められることが理解できた。
- ・超薄片試料の作成には多くのステップがあり、繊細な作業を伴う高度な技術を必要とする

ることがよく分かりました。習得に数年かかるということでしたが、自分もそういうオンリーワンの技術を持てるよう頑張っていきたいと思います。また、髪の毛を使った道具を作られていましたが、創意工夫することも見習うべきことだと思いました。

ウラン化合物や四酸化オスミウムなど厳重な管理を要する物質を使われていたので、その管理についてもどうされているのか伺いたかったです。

- 大学内で走査型電子顕微鏡の取り扱いに関して伺うことが可能な方を紹介して頂いたような講義内容でとても嬉しいです。違いはありますが業務内容について詳細に伺えたので今後の参考にさせていただきたいと思いました。
- 地道で細かな作業に自身の睫毛を利用して行っておられたのは驚いた。
- とても高度な技術と経験を要する業務があることを知り、感心した。次世代の技術職員の養成が大変な気がします。
- 電子顕微鏡の利用について有意義な話が聞けた。顕微鏡の取扱いについて、習得するのにセンスがよくて2~3年かかり、5年くらいだと初心者扱いという話が印象に残った。
- 非常に緻密な作業を手作りの道具を使用して実施されていることが印象に残りました。
- 電子顕微鏡用の生物試料の作り方の勉強ができ良かった。生物試料を作るには、大変細かい技術がいることを知り、大変だと思った。しかし、それらは実際の医師に役立つことができ、素晴らしいと思った。
- 電子顕微鏡を利用するには、経験に基づく技術や知識、様々な工程により処理される資料の特性の把握など、常に大きな人的エネルギーを必要としていることが分かった。まさに技術職員と呼べるのではないか。技術に対しての意気込みを感じた。
- あまり知らない分野の技術でしたが、丁寧に説明して下さったので必要とされている”技術”が良くわかりました。



講義：幸田技術専門職員



質疑応答