

透過電子顕微鏡による広視野観察のための 試料作製法の検討

福 森 信 隆*, 小 縣 昭 夫*

Specimen Preparation for Wide Area Observation Using Transmission Electron Microscope

Nobutaka FUKUMORI* and Akio OGATA*

Keywords : 広視野観察 wide area observation, 超薄切片法 ultrathin sectioning, マウス肝 mouse liver, 透過電子顕微鏡 transmission electron microscope

緒 言

電子線の電子透過性を利用した透過電子顕微鏡（透過電顕と略す）は、光学顕微鏡（光顕と略す）レベルで組織や細胞における変化を検出する前に、細胞内小器官や組織の微細構造を観察することで、化学物質の生体に対する作用を捉えることができる。それにより、以後に起こる生体での障害や病変を推察することも可能である。したがって、電子顕微鏡を用いた病理組織学的観察は、微量な投与物質による生体への影響も検出可能であり、化学物質の生体作用を早期に検出することができるといえる。

生体影響に関して、一般に光顕を用いた病理組織学的観察では、できるだけ多数例の所見を得ることが望ましい。そのためには動物数を増やし多数の試料を作製して、多くの部分を広範囲に観察する必要がある。しかし透過電顕観察では、観察時間に多くの時間を費やし、また広い観察部位を検索することが現実的に難しい場合が多い¹⁾。したがってはじめから透過電顕像を観察するのではなく、大きめに試料を摘出して準超薄切片で広く光顕観察を行い、電顕の検索に必要とする目的の部位を絞り込むことが有利な方法である。特に最近、いわゆる健康食品等の肝障害を引き起こした健康被害事例が騒がれているが、これらの物質の生体作用を広範囲に観察して、早期に病理組織学的変化を検出する場合などにおいても有用であると考えられる。そのため、通常の透過電顕の試料作製における摘出試料の大きさ（約 1 mm 四方）²⁾より、大きく細切した時の微細構造に及ぼす形態変化を調べておく必要がある。

今回、試料作製の過程で固定等の影響を受けやすい肝臓に対して、前固定液の差異と試料の大きさとの関連を微細構造、特に細胞内小器官に及ぼす影響を指標として調べ、広視野観察への適用の可能性を検討した。

実験方法

1. 前固定液の比較と試料作製

動物は 8 週齢の日本チャールスリバーの CD-1 雄マウスを用い、エーテル麻酔後、大腿部動静脈から放血して肝臓の正中葉部を速やかに摘出した。その後、固定液を載せた細切板上で 2 枚のカミソリ刃を交叉させ、適切な大きさに試料を切り出した。

前固定は、0.1M 磷酸緩衝液で調整した 2.5 % の冷グルタルアルデヒド（EM サイエンス社）又は 3 % の冷パラホルムアルデヒド（TAAB 社）に浸漬し、冷蔵庫内で 3 日間の前固定を行った。0.1M 磷酸緩衝液で各前固定液を洗浄後、1 % オスミウム酸（pH7.3, 0.1M 磷酸緩衝液、メルク社）で 2 時間の後固定を実施した。オスミウム酸を緩衝液で洗い、エタノールの 50, 70, 80, 90 % までを低温条件下で、96 % 以上を室温で試料の脱水操作を行った。置換剤（QY-1）で処理後、Polybed 812（ポリサイエンス社）と Araldite M（チバガイギー社）の混合樹脂に包埋した。37, 45, 60 °C に徐々に加温して重合させた樹脂は、はじめに 1 µm の厚さの光顕観察用に準超薄切片を作製して、トルイジンブルー（メルク社）で染色を施した。種々の大きさに細切した試料は、できるだけ広範囲の光顕観察ができるように大きめに切片を作製して、染色性の良否を検討した。

準超薄切片の光顕観察後、試料の外側から中央部にわたるように電顕観察用の超薄切片のトリミングを行った。その後、ミクロトームで銀白色の約 70 nm の厚さの超薄切片を作製し、各種のグリッドに積載して 30 分間の酢酸ウランと 1 分間のクエン酸鉛の二重染色を行った。検鏡は、加速電圧 75 kv の透過電顕（日立、H-7000 型）を用いて観察した。

*東京都健康安全研究センター環境保健部病理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

*Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

2. 試料の大きさの比較

肝正中葉部から摘出した試料は、それぞれ約 1 mm 四方、約 2 mm 四方、約 3 mm 四方の大きさに 3 個ずつ細切して前固定を行った。以後の操作は実験方法の 1 に準じ、光顕用の準超薄切片でトルイジンブルーの染色状態及び透過電顕による細胞内小器官の微細構造への影響を調べた。

3. グリッドの比較

観察領域を広く確保するためには、できるだけ支持台のグリッド格子の電顕像への視野妨害を少なくする必要がある。広視野観察では、透過する電子線の面積が多いほど観察領域が広がる。今回実験に用いたグリッドは、ベコー社の銅製 100 メッシュ標準グリッド、孔径 0.2 mm のパラレルタイプグリッド、孔径 1.0 mm のホールタイプグリッド及び長さ 2.0 mm、幅 1.0 mm のスロットタイプグリッドの 4 種類で、超薄切片の強度や電子染色性について比較検討を加えた。グリッドを補強するための支持膜は張らずに、粘着剤処理を行った。粘着剤は、トルエンに溶解させた 0.2 % のネオプレイン W を使用し、エタノールで洗浄したグリッドを浸した後、ろ紙上で乾燥して用いた。

結 果

1. 前固定液と試料の大きさの比較

実験に用いたアルデヒドの化学固定液は、前固定に通常使用される。他の試料作製の条件を同一にした時、2.5% グルタルアルデヒドと 3% パラホルムアルデヒドの形態に及ぼす影響は、試料の大きさと密接に関連しているため、一括して結果を示した。

2.5% グルタルアルデヒドを前固定に用いた試料の透過電顕写真を図 1 から図 4 に示した。図 1 は、約 1 mm 四方の小さな組織を浸漬固定した試料の電顕像で、核や細胞内小器官が良好に保存されていた。すなわち核膜や核小体が明瞭に観察され、糸粒体も類円形の正常構造を呈し、小胞体、ゴルジ装置、ライソゾーム等が明瞭に観察された。細胞内小器官の間では、グリコーゲン顆粒が電子密度の高い染色性を示した。また、細胞境界及び微絨毛を持つ毛細胆管が確認された。この試料の光顕観察像では、外側部位の染色性が若干強く認められたがほぼ均一であり、また細胞の腫大もみられず、顆粒状構造が明瞭に認められた。

図 2 は、約 2 mm 四方の試料の表層から約 0.2 mm 内側の部位を示した。核は比較的に正常構造を示しているが、細胞内小器官の膜構造の固定が幾分不足しているような像を認めた。グリコーゲン野では多くの顆粒を認めるが、クエン酸鉛による染色性は低下していた。この部の光顕像では、顆粒状構造物は確認できたが、トルイジンブルーの染色性はわずかに低下していた。

図 3 は、約 3 mm 四方の細切試料で、表層から約 0.4 mm 内側の光顕で染色の低下が顕著でない部位を示した。透過電顕像は、大きな試料にもかかわらず、外側部の細胞内小

器官の形態は比較的良好に保持されていた。

図 4 は、約 3 mm 四方の試料で、光顕像で中央部の細胞が腫大して細胞質が明るく抜けてみえる部位からトリミングをした。その部位の細胞質は、粗雑な様相を呈し随所に空胞が観察された。電顕像では、グリコーゲン顆粒の消失が著しく、その部位は光顕像で観察された空胞形成部と一致していた。核や細胞内小器官の膜構造及び基質が不明瞭で、微細構造は極めて悪い保存状態であった。糸粒体は類円形を呈しているが、外形やクリステの構造が不整で全体的に細胞融解の初期と思われる変性像を呈した。粗面小胞体 (RER と略す) の層状配列は乱れ、膜表面のリボゾームの付着が不明瞭であった。滑面小胞体 (SER と略す) は、細胞質内の諸所で集合しているが、膜構造が明らかでなく無構造化していた。また細胞境界が不鮮明で、毛細胆管や微絨毛の突出は、はっきりとみられなかった。

3 % パラホルムアルデヒドを前固定に使用した透過電顕写真を図 5 から図 7 に示した。図 5 は、約 1 mm 四方の試料の中央部の透過電顕像でグリコーゲン野の電子染色が幾分低下しているが、核や細胞内小器官の微細構造は保持されていた。細胞境界は明瞭で、毛細胆管が確認できた。この部位の光顕像の染色は均質であり、顆粒状構造物が明瞭に認められた。

図 6 は約 2 mm 四方に細切した表層から約 0.2 mm 内側の試料で、図 5 とほぼ同様な所見を示した。糸粒体は類円形を呈し、RER の層状配列の不整や囊胞の拡張はみられなかった。

図 7 は約 3 mm 四方の大きさの中央部の試料で、透過電顕像はやや不明瞭であり、特にグリコーゲン顆粒の消失が認められた。また核質の染色性の低下がみられた。RER の層状配列は保持されているが、膜構造の消失が一部で観察された。SER の集合が 2 核間でみられ、この膜構造は、2.5% グルタルアルデヒドを用いた試料よりは、良く保持されていた。光顕観察では、大きく細切した試料にもかかわらず染色性は良好で、顆粒状構造物の存在が認められた。

2. グリッドの比較

広視野を観察する目的のために、図 8 に示した各種のグリッドを用いて、超薄切片の透過電顕観察に使用の可能性を検討した。4 種のグリッドとも前固定液の差や試料の大きさに関して相違は無かった。四角の格子を持つ 100 メッシュの標準グリッド (図 8 の a) は、低倍率の広範囲の観察が可能で、切片の破れは無かった。図 8 の b のパラレルタイプグリッドでは、格子に接着していない超薄切片の末端部が捲れた状態で、電子線照射による試料の動き (ドリフト) がみられた。径 1 mm のホールタイプグリッド (図 8 の c) とスロットタイプグリッド (図 8 の d) は、両者ともミクロトームから超薄切片を積載する時には切片が張られていたが、検鏡してみると破損して切片がグリッドの孔の周囲に絡まっていた。

考 察

広視野の組織観察のために、通常に行われる透過電顕の試料作製過程を試料の大きさあるいは前固定液、使用グリッドについて検討した。病理組織試料では、最終的に組織の微細構造が良好に保持されていることが必要である。光顕観察は、電顕観察を行う部位を選別するためのスクリーニング的検索といえる。今回、前固定液としてグルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒドを用いて、両者の有用性について検討した結果、光顕像ではトルイジンブルーの染色性から、明らかにパラホルムアルデヒドで固定したものが約 3 mm 四方の大きな試料でも、染色は中央部まで均質に染まっており、組織への浸透性が優れていた。しかし、光顕での染色が良好であっても、試料中央部の電顕像は、微細構造の十分な保持がなされていなかった。このことはパラホルムアルデヒドの浸透性では優れているが、組織の保存性には若干固定の不十分なところがあり、細胞の構成成分の保持の違いに影響してくると思われる。このことから、光顕切片による観察では必ずしも、電顕観察の部位を選別することはできないことを示している。今回の結果では、固定する試料の大きさによって明らかに差が認められた。約 1 及び 2 mm 四方の試料ではほとんど問題にならなかったが、これより大きい試料では、細胞内小器官への影響を考慮する必要があると思われる。

これに対してグルタルアルデヒド前固定の光顕像は、大きい試料（約 3 mm 四方）の中央部の染色性が低下して空胞形成を認め、著しく粗雑な像を呈していた。グルタルアルデヒドはたんぱく質と架橋を形成し、強い固定作用を有することから³⁾、試料の中央部に固定液が到達する前に外側の数層の細胞が強く固定され、中まで浸透しなかった結果と考えられる。しかし、この外側部位は光顕で顆粒状構造がみられ、染色性が良好であり、電顕像でも著しい影響を受けていないことから、検査試料として用いることが可能と思われる。一方、中央部の電顕像で、明るくグリコーゲン顆粒の消失傾向がみられたことは、固定が不十分で顆粒成分が溶出したためと思われる。また微細形態の保持が悪く、核や細胞内小器官の構造変化は、自己融解の像に類似していた⁴⁾。自己融解は、前固定液が生物反応を停止させ、組織を構成している成分の速やかな安定化がなされなかったことによることから、徐々に進行していくと推察される。このことは固定液が浸透していく過程での変化であり、本来の正常構造ではない、固定による人工産物を形成している可能性が強い。したがって、大きな試料でグルタルアルデヒド固定をした場合、固定の良好な部位は、表面近くの約 0.2 mm 内側に入った部分に限られることが明らかになった。

ゆえに、グルタルアルデヒドによる前固定を行う場合、病理組織の電顕観察には、試料をできるだけ小さくすることが適当と考えられる。

切片を積載するグリッドの比較で、孔径の広いホールタ

イプとスロットタイプのグリッドでは、切片が破れて検鏡することができなかった。薄切した際にはグリッドに載っていたが、その後の電子染色を行う過程で破損したと考えられる。今回は、グリッドに支持膜を張らないで粘着剤処理のみで使用したが、染色の洗浄で切片の強度が耐えられなくなり、破損したと思われる。おそらく電子線の照射に対しても弱いと推測される。支持膜は試料の作製過程や電子線に対して補強の役目をするが、試料のコントラストを低下させ、汚染の原因となる場合が多い。しかし、異物の識別のような特殊な試料を観察する時には、支持膜を張った孔径の大きなグリッドを用いた観察が、極めて有用な方法と思われる⁵⁾。実際に広視野を観察する目的で検鏡可能なグリッドは、格子のある標準グリッドとスリットのあるパラレルタイプグリッドに限定された。標準グリッドは格子の大きさが各種あり、目的に応じて選択が可能である。100 メッシュの格子のグリッドがドリフトを最小限に抑え、広い視野の観察ができることから、組織や細胞内小器官の検索に適当と考察される。

結 語

透過電顕による試料の広範囲の観察を目的に、細切した試料の大きさあるいは前固定液の種類及び積載するグリッドを比較し、試料作製の基礎的方法の一環として検討を加えた。2.5 %グルタルアルデヒドでは、試料が大きいと組織の内部まで固定液が浸透できずに、外側部位の表層のみの固定にとどまった。しかし、約 1 mm 四方の小さな試料では、グルタルアルデヒドが膜構造や細胞内小器官の保持に対して、良好な結果を示した。3 %パラホルムアルデヒドでは、組織への浸透性が良く、約 2 mm 四方の試料でも細胞内小器官の観察には、十分適用可能であることが分かった。また、切片を積載するグリッドは、100 メッシュの標準グリッドの使用が適当と考察された。このことから、電子顕微鏡による病理組織観察を行う場合には、組織を摘出する際の数や時間等の諸条件を考慮に入れ、パラホルムアルデヒド溶液に浸しながら細切し、その後グルタルアルデヒドで再固定するのも良い方法と考える。

文 献

- 1) 日本電子顕微鏡学会関東支部：医学・生物学電子顕微鏡観察法, 77-101, 1982, 丸善, 東京。
- 2) 橋本初次郎, 小川和郎, 他：電子顕微鏡学事典, 612-613, 1991, 朝倉書店, 東京。
- 3) 日本電子顕微鏡学会関東支部：医学・生物学電子顕微鏡観察法, 120-132, 1982, 丸善, 東京。
- 4) 日本病理学会：電子顕微鏡による細胞病理学図譜, 81-90, 1967, 岩波書店, 東京。
- 5) 福森信隆, 青木直人, 佐々木美枝子：東京衛研年報, 49, 305-310, 1998。

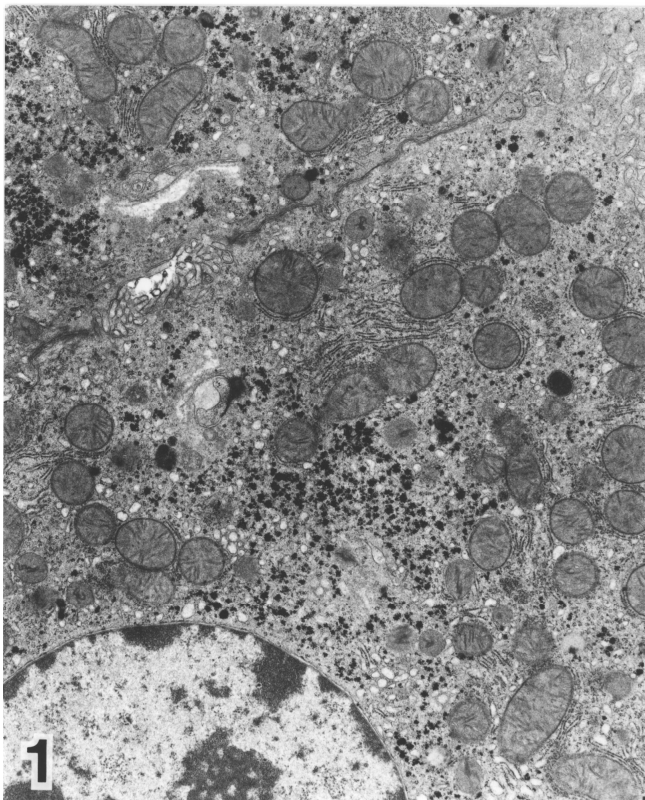


図 1. 2.5 %グルタルアルデヒド前固定を行った約 1 mm 四方の肝臓. 核や細胞内小器官の微細構造は, 良好に保持されている. ($\times 8,000$)

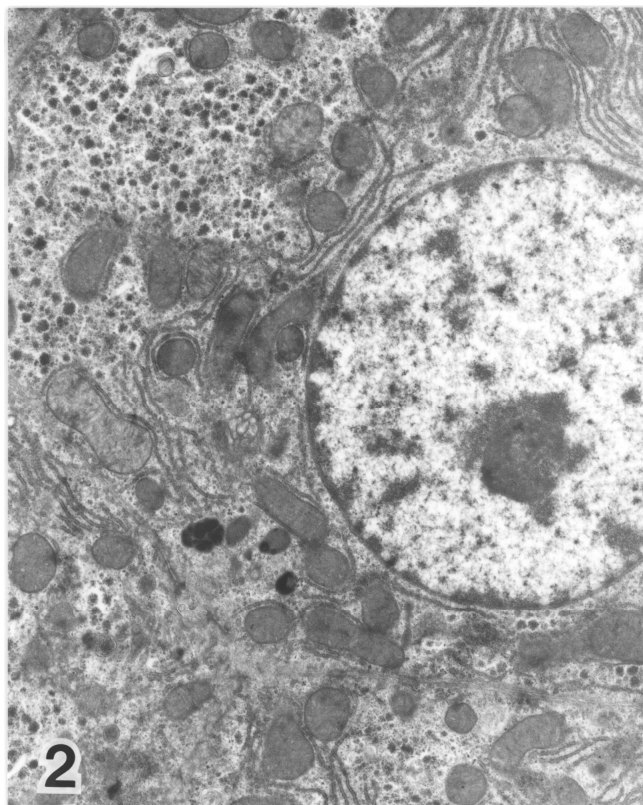


図 2. 2.5 %グルタルアルデヒド前固定を行った約 2 mm 四方の肝臓. 核は正常構造を示すが, 細胞内小器官の膜構造に不整がみられる. ($\times 8,000$)

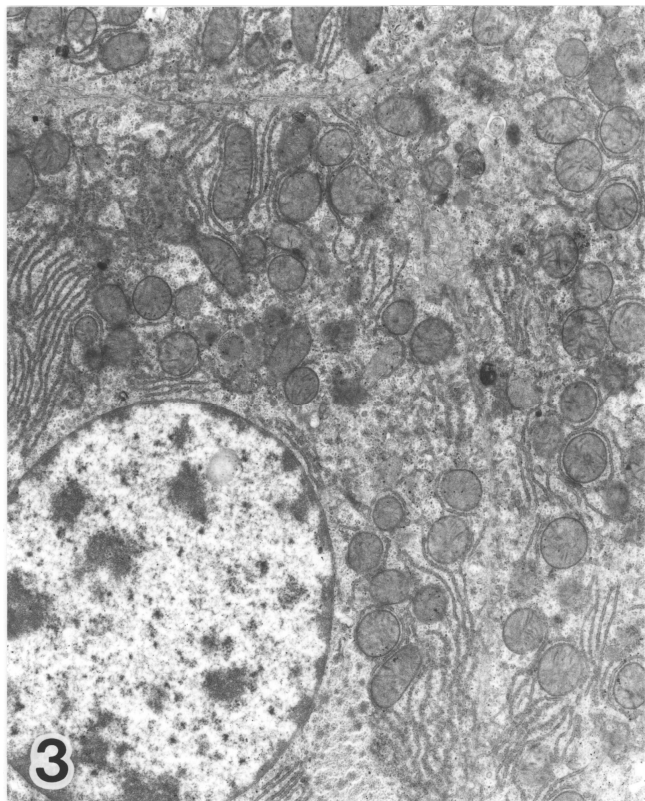


図 3. 2.5 %グルタルアルデヒド前固定を行った約 3 mm 四方の肝臓の外側部. 細胞内小器官は比較的保持されているが, グリコーゲン顆粒の消失傾向を認める. ($\times 8,000$)

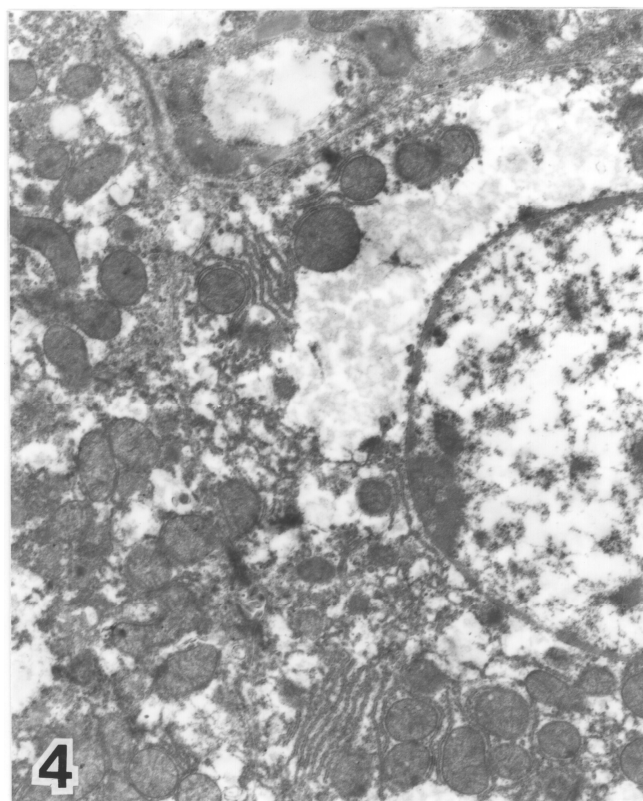


図 4. 2.5 %グルタルアルデヒド前固定を行った約 3 mm 四方の肝臓の中央部. グリコーゲン顆粒の消失が著しく, 核や細胞内小器官の膜構造及び基質が不明瞭である. ($\times 8,000$)

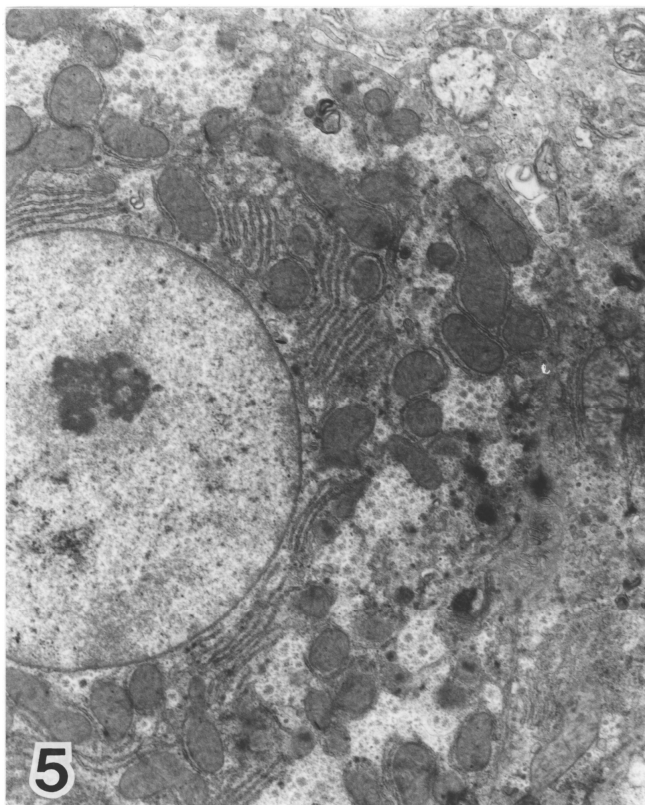


図 5. 3 %パラホルムアルデヒド前固定を行った約 1 mm 四方の肝臓。核や細胞内小器官は保持されているが、グリコーゲン顆粒の軽度な消失がみられる。(×8,000)

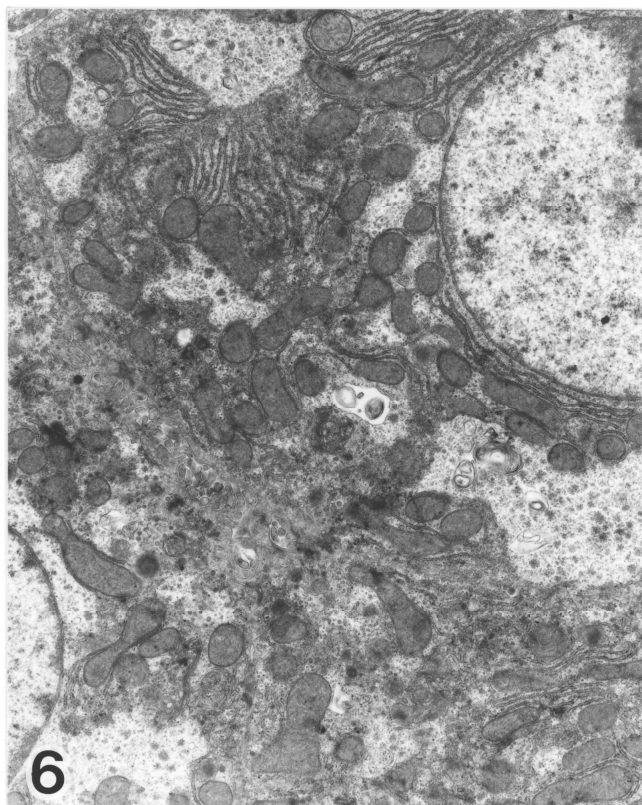


図 6. 3 %パラホルムアルデヒド前固定を行った約 2 mm 四方の肝臓。糸粒体や小胞体に著しい変化を認めず、図 5 と同様な所見が観察される。(×8,000)

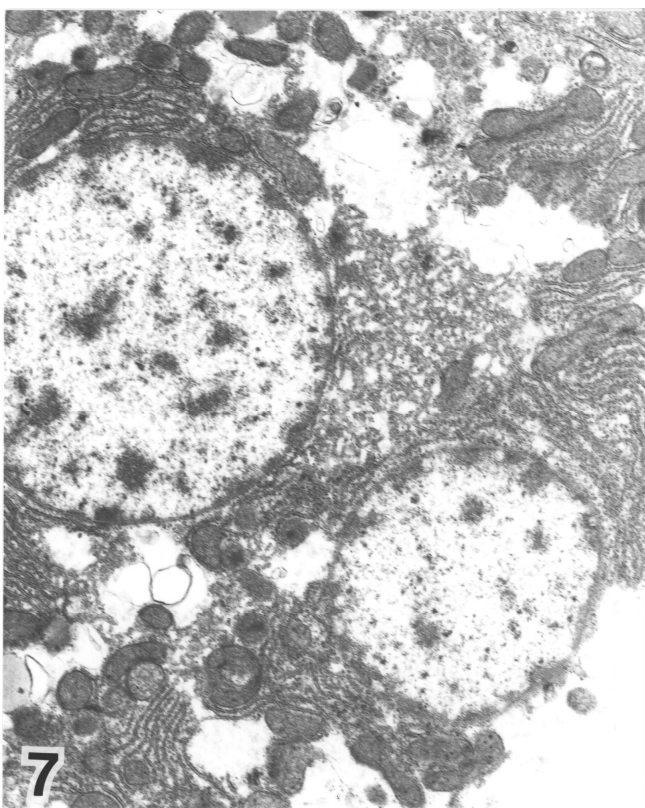


図 7. 3 %パラホルムアルデヒド前固定を行った約 3 mm 四方の肝臓の中央部。グリコーゲン顆粒の消失がみられ、核質で染色性の低下を認める。(×8,000)

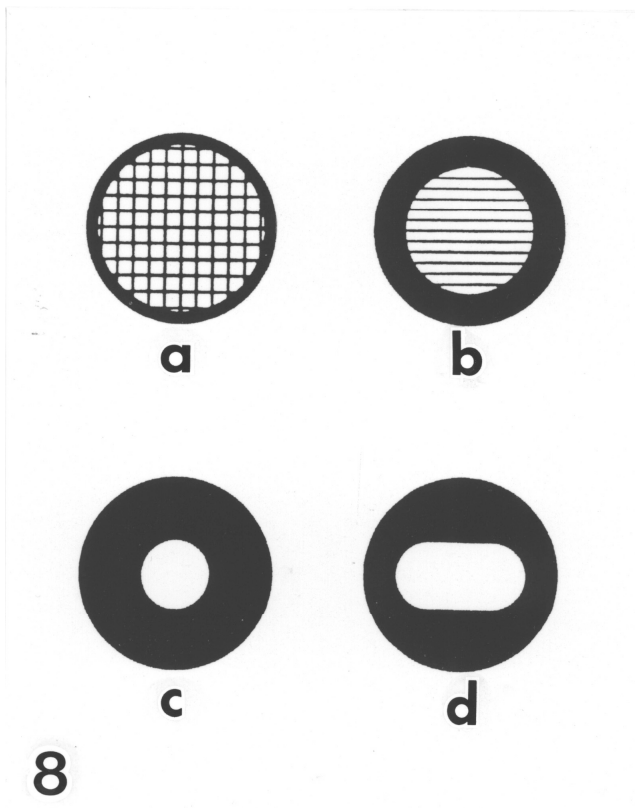


図 8. 標準グリッド (a) とパラレルタイプグリッド (b) 及びホールタイプ (c), スロットタイプ (d) の単孔グリッドの各種を示す。