

透過型電子顕微鏡による培養細胞の観察手法

前野 智和^a, 大久保 智子^b

透過型電子顕微鏡を用いて、培養細胞やその内部に取り込まれたナノサイズシリカ粒子を観察するために、セルカルチャーインサートのメンブレン上に培養した細胞のみを包埋樹脂に転写させ、続いて、培養細胞を完全に樹脂に包埋する手法を考案した。この手法により、切り出した薄切片が破れることなく、培養細胞およびナノサイズシリカ粒子を明確に観察でき、またエネルギー分散型X線分光分析によって細胞内に取り込まれたシリカ粒子に由来するケイ素のピークも確認することができた。

キーワード：透過型電子顕微鏡，培養細胞，ナノ粒子，エネルギー分散型X線分光分析

はじめに

透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope : TEM) および超薄切片法の進歩により、生体試料における細胞内微細構造を詳細に観察できるようになった。これにより、細胞膜や核、ミトコンドリアや小胞体など、細胞組織学における各種解析が進展している^{1,2)}。

また、観察対象がヒト由来の培養細胞にまで広がった結果、微細な構造をもつ物質の生体に与える影響に関する研究も進んでいる。特に、印刷機のトナーや化粧品中の紫外線散乱材など、生活環境中に多用されつつあるナノ粒子を対象とした研究³⁾は必須であり、その研究には微細な構造を見ることができるTEMおよび超薄切片法を用いた培養細胞の観察が不可欠となっている。

当センターでも、マグネタイトやシリカといった物質のナノ粒子をヒト由来の培養細胞にばく露してその影響を調査・研究している^{4,5)}が、その一環として、培養細胞をTEMで観察するための手法も検討しており、考案した観察手法の要点をまとめるとともに、これまでに得られた成果を報告する。

実験方法

1. 試薬

細胞の培養には、RPMI 1640培地、0.25%トリプシン-EDTA溶液および牛胎児血清 (FBS) (いずれもGIBCO®製) を用いた。ばく露したナノサイズシリカ粒子 (以下、シリカ粒子と略す) には、アルドリッチ製No.718483, Silica, nano powder, 12 nm primary particle size (TEM), 99.8% trace metals basisを用いた。

細胞の洗浄および固定には、りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L, pH 7.4) を所定の濃度に調製したりん酸緩衝溶液および70%グルタルアルデヒド溶液を2%に希釈したグルタルアルデヒド溶液 (いずれも富士フイルム和光純薬株式会社製) を使用した。

2. 細胞培養とナノ粒子ばく露

本実験では、ヒト肺上皮由来A549細胞 (American Type Culture Collection) を使用した。A549細胞を、10% FBS含有RPMI 1640培地 (増殖用培地) を用いてセルカルチャーインサートへ播種し、37°C, 5%CO₂・95%空気条件の下で培養ののち、シリカ粒子を液相または気相ばく露した。なお、詳細を別報にて報告した⁶⁾。ただし、液相ばく露時のシリカ濃度を10 mg/mLとした。

ばく露した培養細胞を、りん酸緩衝溶液で培地成分を洗浄し、セルカルチャーインサートごと2%グルタルアルデヒド溶液中に2時間浸漬して固定を行い、定法のアルコール上昇系列により脱水した。

3. 培養細胞の樹脂包埋

脱水後の培養細胞の包埋には、TAAB社製樹脂エポン812セットを用いた。培養細胞はセルカルチャーインサート底面のメンブレン上に増殖していることから、セルカルチャーインサート内に包埋樹脂を流し込み、35°C, 3時間、次に、45°C, 3時間の予備加熱を経て、60°Cで一晩加熱して包埋樹脂を固化した。

固化した包埋樹脂を、培養細胞の増殖したメンブレンと共にセルカルチャーインサート枠より切り取り、続いて、培養細胞が包埋樹脂側に転写された面を傷つけぬよう注意しながらメンブレンを剥がし、露出した転写面にカーボンを蒸着した。さらに、カーボン蒸着した包埋樹脂を型に入れ、これがすべて埋没するよう新たに包埋樹脂を流し込み、上記固化条件にて加熱したあと、さらに60°C, 4日間加熱して、包埋樹脂を完全に固化した (図1)。

なお、カーボン蒸着には真空デバイス社製VES-10 Multi Coating Unitを使用した。

4. 薄切片の作製

包埋樹脂が完全に固化した試料を、砥石をつけたルータ

^a 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部生体影響研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科

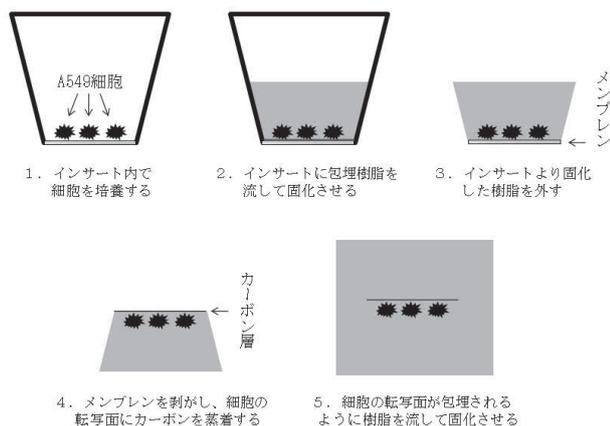


図1. 培養細胞の樹脂包埋手順

一にてトリミングし、マイクローム用試験片（以下試験片と略す）とした。

ホルダーを介して試験片をマイクロームに取り付け、鋼製ナイフで培養細胞が露出する近傍まで削ったあと、面出し用ダイヤモンドナイフにて表面の平滑化および周囲の面取りを行った。その後、厚みが80 nmから150 nm程度の超薄切片になるよう、試験片を薄切用ダイヤモンドナイフで切削した。薄切片を直径3 mmのグリッドにすくい取り、乾燥後TEM観察を行った。なお、薄切にはライカ社製ウルトラマイクロームEM UC7を使用した。

5. TEM観察

細胞にばく露したシリカ粒子および上記のとおり作製した薄切片を、加速電圧80 kVから200 kVの間でTEM観察した。さらに薄切片では、観察角度を50度から-40度の間で傾斜させて観察するとともに、同じ観察視野をエネルギー分散型X線分光分析（Energy Dispersive X-ray Spectrometry : EDS）にて元素分析した。なお、TEM観察には日本エフイー・アイ社製Tecnai F20を、EDS分析はEDAX社製EDS検出器を使用した。

6. シリカ粒子の粒径分布

細胞にばく露したシリカ粒子の10 mg/mL（1%）溶液を作製し、0.1 mL/minの流速で2 L/minの乾燥空気に分散させ、Wide-Range Particle Spectrometer 1000XP（MSP）を用いてシリカ粒子の粒径分布を調べた。

結果と考察

1. シリカ粒子

写真1に、細胞にばく露したシリカ粒子のTEM像を示す。ばく露したシリカ粒子には、粒径10 - 20 nmの細かい粒子と40 - 50 nmの粗い粒子の2種類が含まれていた。シリカ粒子の粒径分布（図2）からも2種類の粒子が含まれていることを確認した。TEM像での粒径に比べて、粒径分布での粒径が大きいのは、凝集した二次粒子を測定したためと推察した。

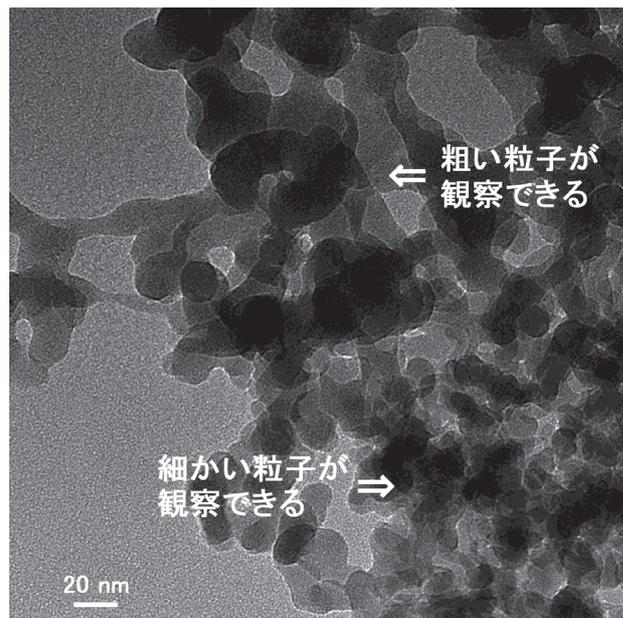
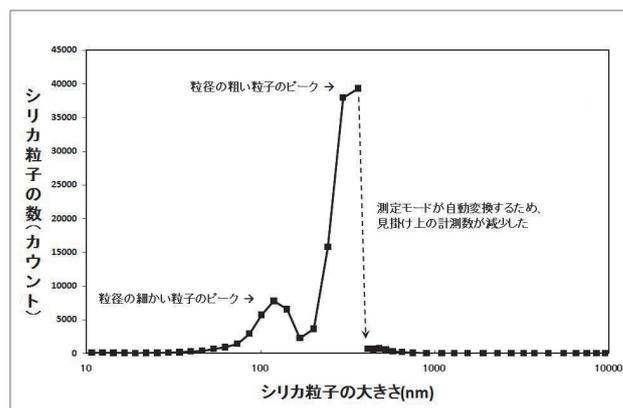


写真1. 培養細胞にばく露したシリカ粒子のTEM像

図2. 培養細胞にばく露したシリカ粒子の粒径分布
なおシリカ粒子は別報⁵⁾のシリカ②に該当する

2. TEM像の観察並びにEDS分析結果

写真2に、培養細胞に取り込まれたシリカ粒子のTEM像を示す。包埋樹脂部分とカーボン層の間にある培養細胞部分にシリカ粒子がみられることから、シリカ粒子は培養細胞に取り込まれたと判断できた。左下の拡大写真では、スケールバー（写真中の白線）の長さが100 nmであることから、シリカ粒子の粒径が40 - 50 nmであると推察した。

写真3の左上および右下に、写真中央の粒子（写真2と同じ撮影角度0度のTEM像）を各々撮影角度+50度および-40度に傾けて観察したTEM像を示す。いずれも写真中央の粒子よりも横方向の粒塊長が短くなり、+50度では左端の粒子が、-40度では右端の粒子がそれぞれ手前に見えることから、シリカ粒子の培養細胞内に取り込まれていることと深度方向に厚みのあることを観察した。

写真4に、異なる部位に取り込まれたシリカ粒子のTEM像を示す。写真2に比べて、多数のシリカ粒子の取り込みを確認できた。

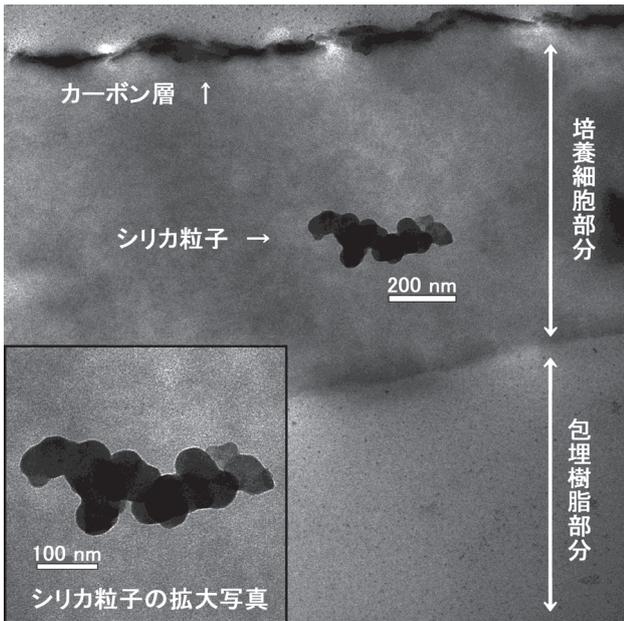


写真2. 培養細胞に取り込まれたシリカ粒子のTEM像および粒子の拡大写真（左下）

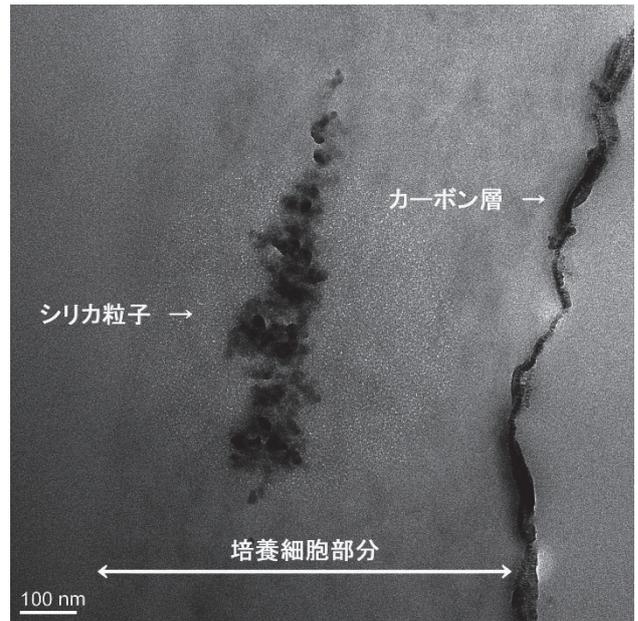


写真4. 培養細胞に取り込まれたシリカ粒子のTEM像（粒径の細かい粒子を観察した）

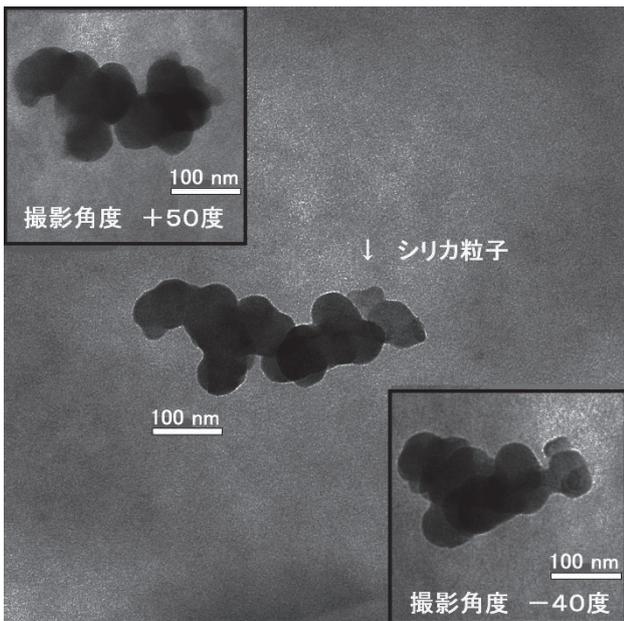


写真3. 写真2の像（中央）と撮影角度を+50度（左上）および-40度（右下）に傾けた時のTEM像

図3に、写真4と同一視野の画角をEDS分析したスペクトルを示す。シリカ粒子の主成分であるケイ素のピークは、その左側にある銅のピーク（グリッド由来）よりも大きいため、確実にシリカ粒子が存在すると判断した。なお、右上にはシリカ粒子を観察できない部位のスペクトルを掲載した。この部位では、スペクトル中にケイ素のピークを認めない。

また写真2および4では、培養細胞の近傍に蒸着したカーボン層を観察し、カーボン蒸着によって容易に培養細胞の位置を探索できた。

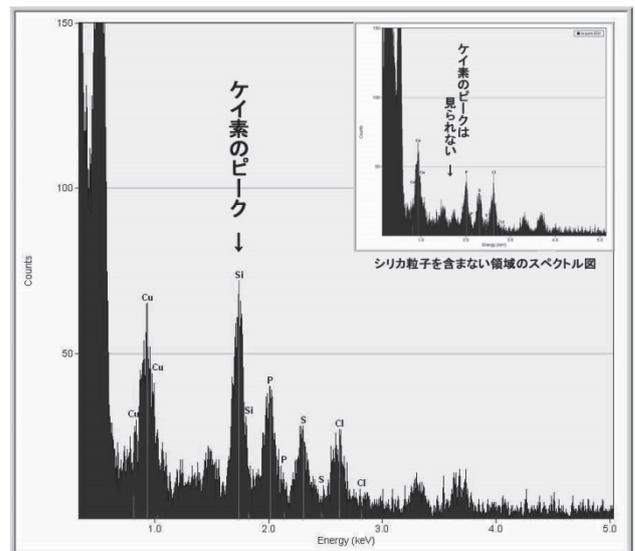


図3. 写真4と同一視野をEDS分析したときに得られるスペクトル図

3. メンブレンの剥離について

セルカルチャーインサートのメンブレン上に培養した細胞をメンブレンとともに樹脂に包埋すれば、観察する薄切片の作製方法は簡便になり、細胞の埋没している部位も判別しやすい。しかしながら、メンブレンを含んだ薄切片では、TEM観察時にメンブレンと包埋樹脂の境界から剥離して破れた。観察前に弱い電子線を当てるなど、破れやすい薄切片をTEM観察する際のいくつかの技法を適応しても、メンブレンを含んだ薄切片の破壊を防ぐことはできなかった。

理由として、メンブレンと包埋樹脂のいずれも電子線照射により収縮し損傷するが、収縮挙動が大きく異なるため、

両者の境界より剥離するものと考えられた。このため、培養細胞の完全な包埋の前に、メンブレンを除去した。これにより、薄切片が破れることなく、培養細胞のTEM観察およびEDS分析を可能にした。

4. カーボン蒸着について

蒸着したカーボンの層によって、TEM観察時に培養細胞を見つけやすくなることは前述した。

包埋樹脂の薄切にあたり、培養細胞の転写面を見つける必要がある。しかしながら、5日間の加熱を経て完全に固化した包埋樹脂では、転写面を見つけ出すことは不可能であった。そのため、転写面にカーボンを蒸着してわずかに黒化することで、転写面を可視化した。

また、カーボン蒸着によって培養細胞を実体顕微鏡で観察することも可能となり、包埋樹脂を薄切する部位の決定に著しい効果があった。

5. 薄切片の染色等について

臓器組織のような生体試料では、グルタルアルデヒド溶液あるいはパラホルムアルデヒド溶液で処理したあとに、オスミウム処理を施して試料を固定するのが定法である。培養細胞についても、この定法に従って処理するべきと考える。しかしながら、本研究では培養細胞中のシリカ粒子を効率的に見つけるために、ケイ素より原子番号の大きい元素の混入を防ぐ観点からオスミウム処理を割愛した。また、細胞内微細構造を明瞭にするための染色も、染色材として元素番号の大きい鉛やウランなどを用いるため、上記と同じ理由で省略した。このため、細胞内微細構造を明確に判別することができず、シリカ粒子が細胞内のどの器官に取り込まれているかを判断することはできなかった。

今後は、細胞中に取り込まれたシリカ粒子を容易に標別でき、かつ、細胞内微細構造を観察できるような固定方法および染色方法を検討したい。

ま と め

透過型電子顕微鏡および超薄切片法を用いて、培養細胞やその内部に取り込まれたシリカ粒子を観察した。培養細胞を樹脂に包埋するにあたり、セルカルチャーインサートのメンブレンを取り除くことで、TEM観察における薄切片の破壊を防止できた。また、包埋樹脂の転写面にカーボンを蒸着することで、薄切時およびTEM観察時に培養細胞の位置を容易に探索できた。

この観察手法を考案したことにより、シリカ粒子がヒト由来の培養細胞に与える影響の調査に貢献できた。

文 献

- 1) 内山安男：組織細胞生物学，原書第3版，2015，株式会社南江堂，東京。
- 2) 太田次郎：大学の生物学 細胞組織学，1978，(株)裳華房，東京。
- 3) 森本泰夫，大神 明，幸地 勇，他：産衛誌，52，201-208，2010。
- 4) 大久保智子，斎藤育江，前野智和，他：東京健安研セ年報，65，217-222，2014。
- 5) 大久保智子，前野智和，小西浩之，他：東京健安研セ年報，69，213-220，2018。

The Observation Technique of Transmission Electron Microscopy for Cultured Cells

Tomokazu MAENO^a, and Tomoko OKUBO^a

To observe cultured cells and nano-silica particles held in them using a transmission electron microscope, the cells were transferred to the embedding resins and removed from the membrane of the cell culture insert. Subsequently, they were covered completely by embedding resins. Using this technique, cultured cells and nano-silica particles held in them were clearly observed. Also, analysis of nano-silica particles using energy-dispersive X-ray spectrometry was possible, without the additional troubles of damage and splitting of sectioning resins by the electron beam.

Keywords: transmission electron microscope, cultured cell, nano-particle, energy-dispersive X-ray spectrometry

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

