



|                  |   |
|------------------|---|
| Title            | 電子顕微鏡用特殊冷却装置とその応用   |
| Author(s)        | 根井, 外喜男; NEI, Tokio   |
| Citation         | 低温科学. 生物篇, 24, 67-73  |
| Issue Date       | 1967-02-10  |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/17714">https://hdl.handle.net/2115/17714</a> |
| Type             | departmental bulletin paper   |
| File Information | 24_p67-73.pdf   |



## 電子顕微鏡用特殊冷却装置とその応用\*

根井 外喜 男

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和41年10月受理)

### I. 緒 言

電子顕微鏡の付属品として、種々の形式の冷却装置が考案され、既に10年程前から市販されている。筆者がそれらの装置を使用した上で、更に改良を試みたのは、次のような目的にもとづく。

まず第一は、細胞を生の状態のまま電子顕微鏡で観察したいということである。試料を鏡検しようとして鏡体内に入れると、高真空にさらされて乾燥してしまうから、水分をもったまままで観察することはできない。従って、切片と否とを問わず、通常の試料はすべて予め脱水乾燥されたものである。ところで、真空中でも試料が乾燥しないように防ぐ対策としては、いくつかの方法が考えられる。そのうちで、まず試みられたものは、いわゆるサンドウィッチ法<sup>1)</sup>で、2枚の薄い膜の間に試料をはさみ、中からの水分の蒸発を防いだものである。次は凍結法で、超低温下に試料を保持して、高真空のもとでも乾燥のおきないようにおさえたものである。これらはいずれも、切片にするのではなく、試料をそのまま観察しようというねらいなので、対象は当然微小な細菌やウイルスに限定されることになる。

最近では、超低温下で切片を作り、その温度のままで鏡検しようとの試みもある<sup>2)</sup>。

第二の目的は、標本作製法としての凍結乾燥法の再検討である。既に周知のように、生物試料をなるべく生に近い状態で形態観察を行なうためには、切片標本作製の過程での従来の固定脱水に代る方法として、また試料そのままの乾燥法として、凍結乾燥法が賞用されている。しかし筆者がさきに報告<sup>3,4)</sup>したように、凍結乾燥法を用いても、乾燥の終末段階での脱水による試料の収縮変形は避けられないようである。このような過程を仔細に吟味するためには、どうしても試料の凍結状態から乾燥の全過程に亘って、一貫して観察できる装置が必要となってくる。

第三の目的は、細菌細胞の種々の低温条件下における形態的变化を知ることである。例えば、細菌のような小さな細胞では、果して細胞内に氷の結晶ができるかどうかの実証がなかった。大きな細胞では、凍結状態をそのまま光学顕微鏡で観察することは可能だが、細菌細胞では、どうしても電子顕微鏡の力を借りなければ細胞内氷晶の有無を確かめることはできないか

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第813号

らである。

以上のような幾つかの目的を果すためには、従来の市販の冷却装置では不十分なので、数年前から日本電子株式会社の技術陣の協力を得て、特殊な冷却装置の開発を試み、漸く完成するに至った。ここにその装置の細部について説明し、あわせて本装置を用いて得られた所見についても述べたい。

## II. 装置並びに方法

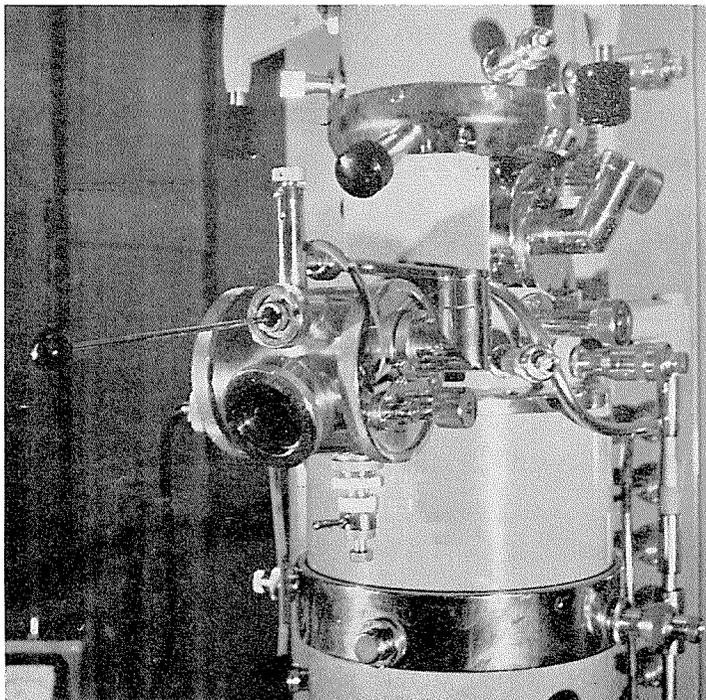
本装置は次の2つの部分から成る。

### 1. 噴霧凍結蒸着装置

これは顕微鏡の試料室の前面にとりつけられるもので、試料の噴霧凍結と乾燥後の蒸着を兼ね行なうことができる。その概略は第1及び2図に示す通りである。

主要部分は、試料筒を載せる冷却台、試料を噴霧する特殊噴霧銃、及び蒸着装置の三つから成る。

1) 試料筒及び冷却台 試料筒が冷却されていると、電子線を照射して観察する時に、試料の上に種々のコンタミネーションをおこす。この現象を過去に経験しているので、それを防止するために膜の張ってないメッシュをもう1枚内側におく。この2枚のメッシュの重ね合せて視野の狭くなるのを避けるためには、同心円状にスリットの入った特殊メッシュを使用する。試料支持膜は冷却されている上に液滴の高速の噴霧があるので破れ易い。従ってコロジウ



第1図 電子顕微鏡にとりつけた噴霧凍結蒸着装置

ム又はフォルムバル膜の上にカーボンを蒸着した補強膜を使用した。

このような特殊試料筒を試料冷却台に挿入する。装置内を排気し真空にしたところで液体窒素を注いで支持台が所要温度になるまで冷す。

2) 噴霧銃 筒の蓋に小さな孔のあいた2枚の板をおき、真空中で急にその1枚を動かして孔を重ね合せると、中の空気は急速に飛び出す。このことを利用して特殊な噴霧銃を作った。孔の大きさはいろいろに加減できるようになっており、試料は他の側の孔に細い毛細管で1滴とっておく。適当なサイズの液滴が噴霧されるためには、孔径、液量、空気量、真空度等がうまく調節されねばならない。

このように準備された噴霧銃をとりつけ銃の頭のエア・ロックを外した上で、銃の

根元の止め金を廻すと、試料は真空中に噴霧され、予め冷却されているメッシュ上に小液滴となって瞬間的に凍結する。この試料筒を顕微鏡本体の試料室中の冷却装置に移して観察を行なうのである。

3) 蒸着装置 観察を行なった試料を再び元の装置内の試料台に戻し、その蒸着装置を用いてシャドウィングを行なう。これは予め内部構造を主として観察した細胞の表面構造をしらべるために必要であり、また凍結乾燥試料では通常の乾燥試料とちがってすべて立体配位をとっているから、シャドウをつけることによって、個々の細胞の立体構造ばかりでなく、細胞集団の相互位置関係をも知ることができる。

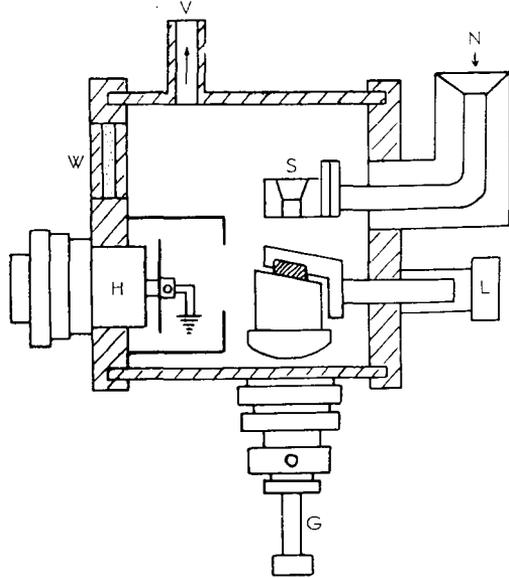
## 2. 冷却ステレオ装置

通常のスtereo装置(試料筒の角度を変えることにより試料の立体像を得る)に冷却装置をつけたもので、本体の試料室内に具備されている。

## III. 観察結果

今回は主として大腸菌の菌液を試料に用いた。寒天培地24時間培養のものを3回蒸溜水で洗い蒸溜水浮遊液としたものである。

**乾燥過程:** 最初凍結状態の観察では、弱拡大で一つのスリット中に幾つかの凍結液滴がみとめられる。個々の液滴の大きさは数十 $\mu$ である。強拡大にしても液滴の層が厚いため内部にある個々の細胞の形は判別できぬ。冷却装置の温度を上げて、 $-90$ 乃至 $-80^{\circ}\text{C}$ にする



第2図 噴霧凍結蒸着装置正面垂直断面図

V, 真空; N, 液体窒素; S, 試料筒;  
L, 噴霧口蓋レバー; G, 特殊噴霧銃;  
H, シャドウ用ヒーター; W, 視窓

と、液滴の周辺から昇華が始まり、中に閉じこめられた細胞が次第に姿を現わしてくる。最後に完全に乾燥された菌体の内部構造や立体配位がよく観察される。この際、電子線照射による試料温度の上昇、及びそれに伴う収縮変形などの起こらぬよう、できるだけ弱い電子線で観察することが必要である。以上の過程は、既に報告された<sup>5,6)</sup> 結果とほぼ同様である。

**乾燥後所見：** 試料台を  $-25$  乃至  $-30^{\circ}\text{C}$  に冷却しておいて、これに噴霧凍結させた試料では、すべて極端に収縮した菌体がみられた。このようなものでも、対照の空気乾燥の場合のように扁平ではなく、場所によって立体的になっていることが、シャドウィングでよくわかる。これらの所見は既に報告した場合と全く同様である<sup>4-7)</sup>。

試料台の温度を極端に低く、液体窒素で冷却できる最低温度（この冷却装置では  $-150^{\circ}\text{C}$  くらい）まで下げておいて噴霧凍結したものでは、3種の形態のものが混在してみられる。

即ち対照の空気乾燥の場合に近い正常の形態と思われるもの、上記の場合のように収縮したもの、及び菌体内に網状或いは蜂窩状構造のみえるもの等である。特に最後の形態のものは、超低温で凍結した時にのみ現われる特殊構造と思われ、その形状から細胞内氷晶が昇華したあとの抜けがらと想像される。しかもそれが単なる表面の凹凸ではなくて菌体内部の構造であることが、ステレオ像から確認された。

この条件の試料では、前記のように3種の形態のものがみられるといっても、一つの液滴の中で混在するのではなく、液滴によって違うことが多い。これはすべての液滴が全く同一条件で凍結するのではないことを示すものと思われる。

**乾燥終末時の収縮について：** 乾燥過程で、菌体周囲の水がすべて昇華して菌体が裸出し、次いで菌体内部からの脱水が行なわれて内部構造がみえてくる時には、菌体は全体として多少収縮するか、或いは菌体周縁部が円滑さを失って粗糙になる。このような乾燥終末時の形態変化は、脱水によるものか電子線の熱作用によるものか、厳密には区別できない。しかし、電子線を照射しないで充分乾燥させたものでも、同様の变化のみみられることから、単に脱水による変化であろうと推定される。

#### IV. 考 察

電子顕微鏡用の冷却装置として新たに改良考案を加えるに当たって、この装置の使用目的として三つをあげた。即ち、生の試料の観察、標準作製法としての凍結乾燥法の検討、及び細菌細胞の凍結時の形態的観察である。

まず第三の細菌細胞については、従来多くの凍結実験で生理機能の変化に関する検討は行なわれているが、細胞内氷晶形成の有無については不明であった。ごく最近 Rapatz and Luyet が、凍結置換法を用いて電子顕微鏡の切片標本を作り、急速凍結試料で氷晶の跡と思われる細胞内の空隙をみとめて報告している<sup>8)</sup>。しかし抄録だけで原著が発表されていないため、それらの写真を見ることはできないが、いずれにせよほぼ同様の結果と思われる。このことは本実験と併行して行なった大腸菌の凍結実験で、凍結乾燥法で作った切片標本にも同様の所見がみとめられたことから肯定されよう。本装置を用いれば、切片標本作製のような煩瑣な方法によ

らなくても、ある程度内部構造はわかるし、その上菌体全体の形態ともならみ合せて観察できるので便宜である。

かつて、市販の冷却装置を使用して実験していた時に、酵母細胞に同様の網目構造をみとめたが、当時はこれが細胞の表面の変化か内部のものか確認できなかった。本装置を用いることによって、更に形の小さな大腸菌についてもその検討が可能になったものといえる。特に従来の装置ではできなかった急速凍結が行なえるようになったので、大腸菌での細胞内氷晶形成の事実も始めて確認されたのであろう。尤も、細胞内にみられる蜂窩状の抜け孔が氷晶の跡であるという直接の証明はなく、ただ大きな細胞その他でみとめられた従来の所見から推定されたものにすぎない。凍結状態のまま電子回折などで細胞内氷晶を確認することは、今のところ不可能なので、直接に証明することは難しい。

次に標本作製法としての凍結乾燥法の検討について述べたい。既に幾つかの報告で述べており、また本実験の結果からもわかるように、凍結乾燥の終末時に試料の収縮変形は避けられないようである。これがいわゆる不凍水分(或いは結合水)の脱水による変化であるかどうかは更に今後の検討に俟たねばならないが、いずれにせよ、従来のように温度を上げてまでも極端に脱水させようとすれば、多かれ少なかれ変形は免れない。とりわけ切片標本よりも、噴霧法などによるウイルスや微小顆粒のサイズの精密測定の際に問題となろう。それを避けるためには、かなり低い温度に冷却して水分の蒸発を制御しながら観察、或いは測定することが必要となる。

最後に、問題の生の試料の電子顕微鏡による観察であるが、これには幾つかの難点が想像される。先ず細胞周囲の水がすべて昇華し、次に細胞内水分の脱水が始まろうとする瞬間をとらえて、そこで脱水を押え、それ以上進行しない一定の状態に保つということが、技術的に極めて困難だからである。またたとえそこで押えることができたとしても、細胞内水分が多ければ水分以外の細胞内構成成分との区別がどこまでできるかが問題となろう。これらの目的には当然超高压電子顕微鏡が必要であろうが、それにしてもある程度の脱水を行わなければ、細胞の内部構造の観察は不可能かもしれない。凍結水分だけ脱水して不凍水分は残すくらいにして観察するのが最も理想的なように想像される。

更に生の状態を観察することを目的とする時は、凍結自身による変化の加わることも好ましくない。その意味で従来いわゆる *vitrification* をねらって急速凍結法が行なわれているが、Luyet も述べているように、生物試料を *vitrify* させることは極めて困難だし、しかも本装置のように極めて急速な凍結の可能だと思われる方法を用いても、なお且つ細胞内凍結と見做される変化のみとめられることから、生物試料特に細胞そのものを *vitreous* に近い状態で凍結させるのは極めて難しいことのように思われる。

以上述べたように、本装置の性能或いは利用価値などについて、今後更に検討の余地があるものと思われる。

## 摘 要

新しく考案試作した電子顕微鏡用の特殊冷却装置、即ち噴霧凍結蒸着装置及び冷却ステレオ装置の構造及び操作について述べた。

更に大腸菌浮遊液について、本装置を用いて行なった電子顕微鏡的観察の結果、 $-25^{\circ}\text{C}$ 凍結では菌体の収縮像、 $-150^{\circ}\text{C}$ 凍結では菌体内に氷晶の跡と思われる構造をみとめた。

標本作製法としての凍結乾燥法、及び生の状態の電子顕微鏡的観察法について考察を行なった。

## 文 献

- 1) Stoyanova, I. and Mikhailovsky, G. 1959 *Biofizika*, **4**, 483. (Stoyanova, I. 1966 Some results obtained while studying bacterial cells in gas microchamber of electron microscope. VIth Intern. Congr. Electron Microscopy, (Kyoto), 265-266 による).
- 2) Fernandez-Moran, H. 1966 High resolution electron microscopy of biological specimens. VIth Intern. Congr. Electron Microscopy, (Kyoto), 13-14.
- 3) 根井外喜男 1962 細胞組織の固定法としての凍結乾燥法の再吟味. 低温科学, 生物篇, **20**, 101-107.
- 4) Nei, T. 1962 Freeze-drying in the electron microscopy of microorganisms. *J. Electronmicroscopy*, **11**, 185-189.
- 5) 根井外喜男 1962 微生物の凍結乾燥過程の電子顕微鏡的研究. II. 大腸菌の 16 mm 映画撮影による動的観察. 低温科学, 生物篇, **20**, 95-100.
- 6) Nei, T. 1962 Electron microscopic study of microorganisms subjected to freezing and drying: Cinematographic observations of yeast and coli cells. *Exptl. Cell Res.*, **28**, 560-575.
- 7) 根井外喜男 1962 微生物の凍結の機構. II. 電子顕微鏡による大腸菌の形態的観察について. 低温科学, 生物篇, **20**, 109-120.
- 8) Rapatz, G. and Luyet, B. 1963 Electron microscope study of the formation of ice in bacteria upon freezing of their suspensions. Paper presented at the Biophys. Soc. Meeting. (Rapatz からの私信による).

## Summary

The structure of specially devised cooling equipments, incorporated into the electron microscope for spray freezing, shadow casting and stereoscopic observation, and experimental procedure with these equipments were described.

Observation of the freezing pattern of *E. coli* cell suspension, treated under various conditions, showed that 1) the cells were extremely shrunken if frozen slowly at  $-25^{\circ}\text{C}$  and 2) the cells retained their original size and shape with rapid freezing at  $-150^{\circ}\text{C}$  but contained numerous small cavities most likely previously occupied by ice.

Some discussions on freeze-drying as a method for preparing specimens and also on electron microscopic observations of undried living cells were made.

## 図版説明

### 図版 I

- 1~3. 噴霧凍結液滴の乾燥過程。凍結液滴中の氷晶が昇華するに従って、その中に含まれた菌体が次第に明瞭にみえてくる
4. 正常菌体 (空気乾燥)
5.  $-25^{\circ}\text{C}$  凍結のもの。収縮像がみられる。シャドウから立体的な配置もわかる

### 図版 II $-150^{\circ}\text{C}$ 凍結のもの

6. 正常形に近いものと、細胞内凍結と思われるものの混在。膜面から離れて立体的な配位をしている
7. 顕著な細胞内空洞
- 8 及び 9. ステレオ装置でそれぞれ  $+5^{\circ}$  及び  $-5^{\circ}$  に傾斜させて撮影したもの。立体鏡でみると内部の空洞の様子がよくわかる

### 図版 III

10. 凍結液滴の乾燥の途中で、菌体の周囲にまだ氷晶が残っている間は、菌体の辺縁は円滑で凹凸はない
- 11 及び 12. 完全に乾燥が終了した時には、菌体の表面がやや粗である



