



Title	走査電子顕微鏡による凍結乾燥試料の形態的観察
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio
Citation	低温科学. 生物篇, 26, 99-104
Issue Date	1968-11-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17744">https://hdl.handle.net/2115/17744</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	26_p99-104.pdf



## 走査電子顕微鏡による凍結乾燥試料の形態的観察\*

根井外喜男

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和43年9月受理)

### I. 緒 言

凍結乾燥法は、生物関係の研究領域において広く応用され、その目的とするところは多岐に亘っている。

第一に、細胞や酵素など、生物活性の長期維持保存が大きなねらいである。生物活性のない物質でも、変性をおこさずに長く保存できるようにする。

次に形態的な立場からは、試料の本来の姿を失わずに標本を作る目的に利用される。

第一の機能的なことをしらべる場合にも、凍結及び乾燥の機構を知るために、形態的な立場から観察する必要のあることがある。このときは、いろいろの条件で凍結乾燥し、乾燥後の状態をそのまま観察するのであるから、試料は、もとの生の状態と違った形態をとっていることが少なくない。ところが、第二の本来の姿をみることを目的とする場合は、それに適するような特殊な方法をとらねばならない。例えば、凍結過程での脱水収縮を防ぐために急速凍結を行なうとか、乾燥過程での脱水に伴う変形を避けるためできるだけ低温での脱水を行なうなど、特別の工夫が必要である。

いずれにせよ、凍結乾燥は試料の立体構造の保持が特徴であるから、形態的観察に当っては常にこの特徴がよくつかめるよう方法の工夫が重要である、試料全体として、或いはその部分として、凍結の状態、乾燥の状態をよく観察するために、光学顕微鏡、或いは電子顕微鏡がそれぞれの目的に応じて用いられてきた。しかも実際に標本を作るに当っては、最初比較的大きな試料を凍結乾燥し、後で観察しやすいように薄片にしたものと、最初から薄層の試料にして凍結乾燥し、そのまま観察するものがある。従来、われわれが液状試料(溶液又は細胞浮遊液)について行ってきた方法を列記すれば次の如くである。

#### I. 光学顕微鏡観察

##### 1. 薄片作製法

- (1) アニリン法 本研究所に於いて開発された方法<sup>1)</sup>で、特に凍結状態の観察に適し、氷の pattern を知るためには、偏光顕微鏡が甚だ効果的である<sup>2)</sup>。さらに乾燥過程の観察にも用いられた<sup>3)</sup>。

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第925号

## (2) パラフィン包埋法

凍結乾燥後、パラフィンに包埋し、マイクロームで切片としたものである。

## 2. 薄層試料

少量の試料を2枚のカバー・ガラスの間に挟み、凍結の過程<sup>4,5)</sup>、乾燥の過程<sup>6)</sup>を観察したものである。

## II. 電子顕微鏡観察

1. 超薄切片作製法 凍結乾燥試料を methacrylate 又は epon で包埋後、ultramicrotome で切片にして電子顕微鏡で観察するもので、細胞の微細構造を見ることを主な目的としている<sup>7,8)</sup>。

## 2. 非切片標本作製法

特殊な装置を用いて試料を噴霧凍結し、その凍結状態或は乾燥過程、さらには乾燥後の状態を電子顕微鏡で観察するものである<sup>9-12)</sup>。

以上のように、目的や試料によって種々の方法が用いられたが、いずれにしても、一長一短のきらいがあった。例えば、光学顕微鏡では、試料の全体像をとらえるにはよいが、そのうちの部分的な微細構造をみるのには解像力が不足である。反対に、電子顕微鏡は全体の観察には不適當である。しかも、両者ともに凍結乾燥試料の特徴であるところの立体像の観察には必ずしも適當とはいえない。

これら従来の観察法に比較して、本論文において述べようとする走査電子顕微鏡には、次のような幾つかの特色があげられる。

1. 表面構造、特に立体像の観察に適している。
2. 前述のような薄層試料や切片を作る必要はなく、試料そのままの観察ができる。
3. 顕微鏡での倍率を、100~10,000 倍くらいの広い範囲で、比較的容易に変えることができる。従って、かなり大きな試料の全体像から局部的な拡大像まで観察が可能である。
4. 電子ビームによる試料の損傷が少ないので、かなり長時間の観察が可能である。

これらの長所をもちながら、一方にはまた短所もあげられる。例えば、現在までに作られている走査電子顕微鏡では分解能が低いため(数百 Å といわれる)、高倍率で微細構造をしらべるのには適しない。

## II. 方 法

今回は、先ず通常用いられる程度の方法で作られた凍結乾燥試料を走査電子顕微鏡で観察したものについて報告する。特殊の条件下での種々の形態についての吟味は、今後更に行なわれる予定である。

### 試 料

1. *Saccharomyces cerevisiae* を1% 蔗糖液又は1% アルブミン溶液に浮遊させたもの。
2. *Escherichia coli* を蒸溜水又は1% アルブミン溶液に浮遊させたもの。
3. ウサギ赤血球の0.15 M NaCl 浮遊液及び ghost 細胞の浮遊液。

### 凍結乾燥法

後の観察の便を考慮して、今回は大体一定量の試料を用いた。即ち、上記細胞浮遊液を1滴(約 0.05 ml)、厚さ 0.2 mm、ほぼ 1 cm 四方の銅板にとり、 $-25^{\circ}\text{C}$  のディープ・フリーザー中に放置して空気冷却により緩慢凍結させたものと、銅板のまま液体窒素中に直接浸して急速凍結させたものの二種を用いた。凍結後予めディープ・フリーザー中に冷却しておいたアンプルに移し、凍結乾燥機にとりつけて、乾燥を行なった。試料は特に冷却せず、容器を室温にさらして乾燥した。冷却速度は測定しなかったが、従来行なったほぼ同様の試料についての経験からして、前者では  $1\sim 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、後者では  $1,000\sim 10,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$  くらいと想像された。乾燥過程での試料温度も凡そ  $-20^{\circ}\text{C}$  前後と思われる。

### 走査電子顕微鏡による観察

上記のように、凍結乾燥した試料をそのまま、或いは剃刀で切断した断面を出すようにして、金属ブロック上に糊付けする。これを真空蒸着器にとりつけ、水平面上 360 度の回転を行ないながら、金で蒸着し、試料表面の coating をした。

走査電子顕微鏡は日本電子製のもので、加速電圧 15 kV、電流  $1\sim 4\times 10^{-11}$  A で写真撮影を行なった。直接倍率は概ね  $100\sim 2,000\times$  の範囲内で、35 mm フィルムを用いて撮影した。

なお、本実験は、研究所において作製した試料を東京に運び、日本電子株式会社電子顕微鏡部門の研究室に於いて写真撮影を行なったものである。芦沼部門長、紀本技術部長を始め担当技術者の協力を深謝する。

## III. 観察結果

### I. 酵母細胞

#### 1. アルブミン浮遊液

凍結時の球面をした試料表面、金属板に接した底面、乾燥後剃刀の刃で切った断面、それぞれ多少異なった表面構造を示す。液滴の表面は凹凸が多く、しかも凍結時の氷のパターンがよくうかがえる。底面は比較的スムーズである。断面はかなり形が崩れて粗面をなしている(図版 I-1)。

倍率を上げて観察を続けると、底面では細胞が密集し、細胞間隙に小粒子状或は網状のものがみえる。これは媒質のアルブミンが乾燥されて残ったものか、或いは菌体内成分が遊離して出たものかはわからない。この面での細胞は、いずれも球形を呈しているが、 $10\sim 20\%$  くらいの割合で、細胞の破壊像がみえる。その損壊の状況を更に詳しく観察すると、細胞内容が殆ど抜け出して殻だけが残ったような状態のもの、内容がまだ多少残っているようにみえるもの等、種々である(図版 I-2, 3, 4)。これは、凍結後乾燥に移る前に、試料の凍結液滴を金属板から剥した時におきた細胞の機械的破壊であろうと想像される。切断面では、菌体間隙に膜様構造が縦横に走っている。また菌体表面に接して小粒子状のものが散在している。この試料液滴の内部に相当する部分では、収縮した細胞がかなりみとめられる(図版 II-5, 6, 7)。

冷却方法の異なるもの、即ち液体窒素に直接挿入したものと  $-25^{\circ}\text{C}$  のディープ・フリー

ザーで空気冷却したものとの間に、形態的なはっきりとした差は見出し難い。むしろ、どちらの場合でも、試料の部位による差違のほうが、目だつほどである。前述のように、金属面に接した部分では、個々の遊離した菌体は球形で、その周囲に粒子状のものが附着しているが、内部や表面では、収縮細胞が多く、しかも膜様のものに包まれた状態になっている。これは試料中の部位による冷却速度の差を示すものと思われる。

## 2. 1% 蔗糖浮遊液

菌体はスムーズな表面をしているが、集団をなした形で個々の菌体の形態は明らかでない(図版 II-8)。これは乾燥後蒸着までの間、及び蒸着後検鏡までの間で吸湿し、媒質がやや融けた状態になったための変形と思われる。

# II. 大腸菌

## 1. 蒸溜水浮遊液

酵母の場合と同様、冷却方法による差はあまりはっきりしない。むしろ試料中の部位による凍結のパターンの違いのほうが明瞭である(図版 III-9)。

倍率をあげて個々の細胞の形態をみると、収縮像を示すものが多い(図版 III-10)。菌体相互の間を紐状のものが結んでいるが、これは培地成分の残りか、菌体内部から遊出した成分の乾いたものであろう。密集した個所では、個々の菌体の形態は判別しにくい。

## 2. アルブミン浮遊液

大体の傾向は蒸溜水浮遊液のものと同じである。ただ一般に菌体の収縮像はそれほど顕著でない。実際に収縮していないのか、媒質に包まれたためはっきりしないのか、いずれかわからない。

蒸溜水浮遊液の場合もそうであるが、低倍率での凍結のパターンは実によく現われている(図版 III-11, 12)。けれども、高倍率で個々の菌体の形態を詳しく観察するためには、本顕微鏡の分解能は充分でない。

# III. ウサギ赤血球

未固定又は  $\text{OsO}_4$  で固定した血球で、定型的な円盤状乃至ドーナツ状の形態がみられる。中には多少凹凸の多い不規則な形を呈するものがあるが、これは乾燥時の artefact によるものかもしれない(図版 IV-13, 14)。

蒸溜水で溶血した後の ghost を生理食塩水に再浮遊したものでは崩れた形態のものが多いが、 $\text{OsO}_4$  で固定したものでは、殆んど球形をなしている(図版 IV-15, 16)。

凍結融解や高張塩溶液によって溶血をおこした後の ghost の形態には種々の変化がみとめられるが、これらについては更に詳細な吟味を加えてから報告したいと思う。

# VI. 考 察

緒言でも述べたように、生物試料、特に遊離細胞の観察の方法として、光学並に電子顕微鏡が用いられる。光学顕微鏡は、細胞全体の生の状態を知るのには適当であるが、微小な細胞ではその解像力の限界を越えるために、微細構造の観察のできない場合が多い。また電子顕微

鏡では、その逆に、微細構造の観察には適するが、生の状態、特にその外形の全体を知ることが難しくなる。このような場合に、両種顕微鏡の中間を行く形で、走査電子顕微鏡が活用されるのである。即ち、倍率をかなり広範囲にしかも比較的容易に変えることができる上に、試料の立体的構造を観察し得るといふ甚だ便宜な特色をもっているからである。

一方、凍結乾燥試料は、立体的配位をとったまま乾燥されるという特徴がある。凍結や乾燥の条件を吟味することによって、試料全体として或いはその中に含まれる細胞自体の生のままの状態をうかがい知ることができるであろうし、またいろいろな条件で、凍結乾燥された試料の形態的な観察も行なうことができる。これらの目的には、走査電子顕微鏡は実に便利な道具であるといえよう。

本顕微鏡自体が最近の開発によるものではあるが、凍結乾燥そのものの形態的研究に、本装置が利用されたという報告をまだ聞いていない。本論文は、凍結乾燥研究の分野に走査電子顕微鏡が利用でき、しかも極めて有力な道具であることを紹介したものであって、具体的な種々の条件下での各種試料の形態的所見については、更に今後の研究に俟ちたい。

## V. 要 約

大腸菌、酵母細胞及びウサギ赤血球等を試料として、凍結乾燥標本を作り、走査電子顕微鏡で観察した。その結果、走査電子顕微鏡は、立体的構造をもった試料について、特に試料全体としての形態、或いは試料内部に含まれる個々の細胞の形態を観察するのに適していることが確認された。

## 文 献

- 1) 木下誠一・若浜五郎 1959 アニリン固定法による積片の薄片. 低温科学, 物理篇, **18**, 77-96.
- 2) 根井外喜男・浅田 実 1960 凍結乾燥に於ける乾燥の機構 V. 薄片標本による形態的観察. 低温科学, 生物篇, **18**, 91-98.
- 3) 根井外喜男・浅田 実 1961 凍結乾燥に於ける乾燥の機構 IX. 薄片標本による形態的観察. 低温科学, 生物篇, **19**, 73-78.
- 4) 根井外喜男 1965 溶液の凍結 I, II, III. 血漿, グルコース, グルコース加血漿中の水晶と再結晶. 低温科学, 生物篇, **23**, 149-156, 157-162, 163-172.
- 5) 根井外喜男 1964 凍結及び乾燥による試料の亀裂, 特に溶液の薄層標本についての顕微鏡的観察. 低温科学, 生物篇, **22**, 133-138.
- 6) 根井外喜男・浅田 実 1965 凍結乾燥による試料の亀裂, 特にアルブミン溶液についての乾燥過程の観察. 低温科学, 生物篇, **23**, 173-178.
- 7) 小島義夫 1965 家兎血液の凍結による障害 III. 電子顕微鏡による形態学的観察. 低温科学, 生物篇, **23**, 129-148.
- 8) 根井外喜男・荒木 忠・松坂聖夫 1967 微生物の凍結 IV. 大腸菌における細胞内水晶形成の機構. 低温科学, 生物篇, **25**, 114-118.
- 9) 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.
- 10) Nei, T. 1962 Freeze-drying in the electron microscopy of microorganisms. *J. Electronmicroscopy*, **11**, 185-189.
- 11) 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.

- 12) 根井外喜男 1966 電子顕微鏡用特殊冷却装置とその応用. 低温科学, 生物篇, **24**, 67-73.

### Summary

As results obtained from experiments using freeze-dried preparations of yeast, *E. coli* and red blood cells, it was ascertained that the scanning electron microscope is of good use for observing the three-dimensional structure of biological specimens.

### 図版説明

#### 図版 I

1. 酵母の1% アルブミン浮遊液。-25°C の低温槽で凍結。図の右半分 (三角形の部分) は底面, 左下半分は断面, 上方は表面。×100
2. 上の試料の底面の一部を拡大。×1,000
3. 2の一部を拡大。×3,000
4. 3の一部を拡大。粒子状のものが, 細胞表面や細胞間に散在している。種々の程度の細胞の破壊像がみられる。×10,000

#### 図版 II

5. 同じ試料の表面の一部を拡大。球形の細胞の間に収縮細胞や破壊細胞がまじっている。細胞間に膜様の層状構造がみられる。×3,000
6. 5の一部拡大。収縮細胞と破壊細胞。×10,000
7. 同じ試料の断面の一部。球形細胞と収縮細胞が混在し, 細胞表面及び細胞間に粒子及び膜様構造がみられる。×3,000
8. 酵母の1% 蔗糖浮遊液。-25°C 凍結。細胞集塊をなしている。×3,000

#### 図版 III

9. 大腸菌の蒸留水浮遊液。-25°C 凍結。液滴表面の凍結によるパターンを示す。×300
10. 同じ試料の底面部分にみられる個々の菌体の収縮像。×20,000
11. 大腸菌の1% アルブミン浮遊液。-25°C 凍結。表面。×100
12. 同じ試料の底面 (右側) と断面 (左側)。×100

#### 図版 IV

13. ウサギ赤血球の 0.15 M NaCl 浮遊液。液体窒素凍結。円盤状並びに収縮細胞が混在。×2,000
14. 13の一部拡大。×6,000
15. 蒸留水溶血による ghost cells。OsO<sub>4</sub> にて固定。殆ど球状を呈している。×2,000
16. 15と同じ試料。×6,000







