



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	フリーズ・エッチング法における凍結剥離の一技法：サンドウィッチ法
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 浅田, 実 他
Citation	低温科学. 生物篇, 31, 67-72
Issue Date	1974-01-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17808
Type	departmental bulletin paper
File Information	31_p67-72.pdf



フリーズ・エッチング法における凍結剥離の一技法*

サンドウィッチ法

根井外喜男・浅田 実

(低温科学研究所)

(昭和48年7月受理)

緒 言

生物試料を電子顕微鏡で観察するには、光学顕微鏡のように試料をそのままみるというわけにはいかず、必ず何らかの処理をしなければならない。特に超薄切片標本などでは種々の物理的・化学的操作が加えられるので、*artefact* の生ずるおそれがある。そこで、このような *artefact* のおこるのを避け、特に乾燥による影響を防いで、しかも試料のなるべく生のままの姿、すなわち水をもった状態をみたいという希望が多くの研究者にあった。これまでに試みられたいろいろな工夫のうちで、凍結法 *cryotechniques*¹⁾ とよばれる一連の方法は、その代表的なものである。古くは凍結乾燥法 *freeze-drying*、凍結置換法 *freeze-substitution*、近くは凍結破断法 *freeze-etching* などがあり、それぞれの特徴をもっている。

これらの凍結法は、いずれもできるだけ *artefact* を少なくすることをねらいとしているにもかかわらず、一方、この方法自身のために新しい *artefact* のおこる可能性がある。凍結による形態的変化としてあげられるところの氷晶の形成がそれである。

そこで、この新たな *artefact* のできるのを防ぐために、いろいろの工夫がこらされた。試料中の水分が、定型的な氷晶を作らず、なるべく非晶状態 *amorphous state* で凍結するように試料の急速凍結や凍害防止剤 *cryoprotectant* の添加が試みられ、多くの成果をあげてきた。

急速凍結をするためには、冷す側と冷される側の両方の工夫が必要である。前者では、熱伝導がよくて沸点や融点が低く、しかも引火の危険の少ないフロンが寒剤として多く用いられ、液体窒素で -150°C くらいまで冷して使用される。後者では、試料の量をできるだけ少なくするために、液状試料などでは、噴霧凍結^{2,3)} が試みられた。

1957年に創案されたフリーズ・エッチング法は、近年に至って急速に普及し、市販の装置も数種に上るようになった。著者らがこれまで使用したもの⁴⁾は、試料台にのせた試料を凍結した後、装置内のコールド・ステージに移し、適当な温度や真空度に達したところで、予め冷してあるナイフで凍結試料を破断するという方法である。ここまでの過程では、研究者あるいはメーカーによって異った装置と操作が採用されているが、この後の破断面の蒸着、レプリカ膜の洗滌などの過程は、いずれも大差はない。われわれの方法では、ナイフで割るために、試

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1254号

料は液滴にして試料台から盛り上げるようにしておかねばならず、どうしてもかなりの量を要した。その結果、試料の冷却速度をおとすばかりでなく、試料の部位（表層とか内部とか）、いいかえればレプリカ面での場所によって、冷却速度の差による凍結像の相違のあることがわかった⁵⁾。

そこで、同じ装置を使いながら、少しでも試料の冷却速度をあげるとともに、部位による差のない均一な所見の標本の得られことをねらって、本報告で述べるようなサンドウィッチ法を試みたのである。

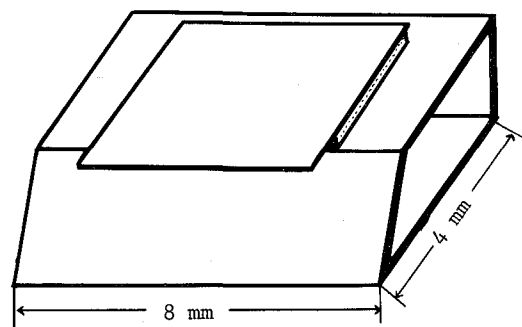
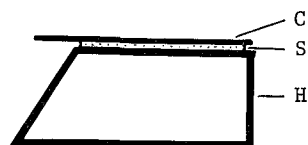
材料と方法

装置： フリーズ・エッチング装置としては、日本電子製 EE-FED を用いた。

試料台： 前述のように、急速凍結と均一所見をねらって、2枚の金属板の間に少量の試料を挟んで薄層とし、急速凍結後、一方の金属片だけを剝し、その面のレプリカを作ることを試みたものである（第1図）。

実際には、試料台は、厚さ 0.3 mm、大きさ 8×13 mm の銅板から成り、これを蒸着装置のコールド・ステージに装着できるように折り曲げて、マッチの外箱のような形にしたものである。もう1枚の金属板も銅板で、厚さ 0.1 mm、大きさ 5×5 mm のものである。あまり薄いと、ナイフをあてて剝離するときまがるおそれがある。この両金属板の間に試料を挟むのであるがここにすこし工夫がある。金属板そのままだと面が滑らかなため、凍結後の剝離の際試料が割れないで試料と金属面との間で剝がれてしまう。そこで凍結試料の大部分が試料台に残り、表面のごく薄い層だけがカバーの金属片といっしょに剝離するように、試料台には鋭利なナイフですこし深い溝を、カバー片にはサンド・ペーパーで粗面を、作るようにしておく。

試料： 試料には細胞浮遊液を用い、その 0.003 ml をツベルクリン注射器で試料台にのせる。その上にカバー片をのせると、試料はほぼ均一に拡がる。あとでナイフで剝がすときの便を考えて、カバー片の端を試料台からすこしはみ出させておく。したがって薄層となった試料自身の厚さは大体 0.15 mm くらいと推定される。これを予め液体窒素で -150°C くらいに冷したフロンに投入すると急速に凍結する。このときの凍結速度を、0.1 mm 径の銅・コンスタントンの熱電対を用い、横河製の電磁オツシロで測定したところでは、ほぼ $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 程度であった。凍結後、試料をいったん液体窒素に移し、フリーズ・エッチング装置の準備ができた。



第1図 サンドウィッチ法に用いた試料台

C: カバー銅板, S: 試料, H: 銅試料台

ば、その冷却台の上に載せて直ちに装置の減圧を開始する。真空度が 10^{-5} mmHg 台で 10^{-6} mmHg に近く、また試料温度 (実際には cold stage の温度) が -100°C 附近に達した頃、予め冷却してあるナイフを作動させ、カバー片の端にあてて急速に上にはね上げると、大部分の試料は試料台に残ってその断面ができる。

これから後の操作は、通常のフリーズ・エッチング法のそれと全く同一で、適当な温度と時間でエッチングをし、白金パラジウムとカーボンの蒸着をする。その後、真空装置からとり出し、ブリーチあるいは硫酸を用いて試料の溶解洗滌をし、レプリカ膜を拾って電子顕微鏡で観察するわけである。

結 果

1. ヒト赤血球

生理食塩水で洗ったヒト赤血球を、10, 20, 30% グリセリン加食塩水にそれぞれ浮遊させたものを試料とし、本サンドウィッチ法 (0.003 ml) と液滴法 (0.01 ml) との比較を行なった。10% グリセリンでは、両者ともに細胞の内外に氷晶の形成をみるが、サンドウィッチ法のものの氷晶がかなり小さい。20% になると、液滴法ではまだ細胞内氷晶がみとめられるのに、サンドウィッチ法のものでは、もはや細胞内氷晶はみとめられぬくらい小さい。液滴法の30% のものの所見がほぼこれに近い (図版, 写真1~5)。これらの結果から、本法によれば、従来の液滴法よりかなり冷却速度は大きく、凍害防止剤の濃度が少なくても良い成績が得られることがわかった。さらに、液滴法では試料中の部位によって冷却速度に差があり、したがって凍結の所見にも差ができた⁵⁾ が、本法では、ごく薄い層の試料であるから、部位による所見の差はほとんどないし、また剝離面が広いのでレプリカ膜も十分に拾うことができるという利点があった。

2. 酵母細胞

20% グリセリン水浮遊の *Saccharomyces cerevisiae* についても、本法による標本で、従来得られている細胞の断面での細胞内微細構造 (図版, 写真6)、膜の剝離面での invagination や結晶様格子構造がよくみとめられた。

考 察

緒言で述べたように、電子顕微鏡学で用いられる凍結法では、artefact としての氷晶の生成を防ぐために、最初の過程の凍結の段階で、冷却速度を大きくするための工夫として、これまでにいろいろの試みがなされている。噴霧法^{3,6)} や油に浮遊させる法⁷⁾ などがその代表的な例である。

著者らはかねて急速凍結の目的、あるいは凍結試料の光学顕微鏡的形態観察に、ガラスや金属によるサンドウィッチ法を利用^{8,9)} していたが、今回はこれを電子顕微鏡のレベルに応用してみたのである。試料の直接観察には、MacKenzie のフィルムによるサンドウィッチ法¹⁰⁾ があるが、われわれの方法は特にフリーズ・エッチング法の一過程としてとり上げられたものである。したがって、凍結試料の破断面を作ることに工夫がこらされ、試料をはさむ両面の金属板にそれぞれ適当な処理をしたものである。このようにして得られた試料の観察の結果、本法

にいくつかのメリットがみとめられた。(1) 冷却速度は従来の液滴法⁵⁾に比較してかなり大きい。(2) 観察所見からしても、生成される氷晶は小さく、液滴法よりグリセリンは低濃度ですむ。(3) 得られたレプリカ像では全体に比較的均一で、試料中の部位による差はあまりない。(4) 試料の断面が広く、得られるレプリカが大きいので、鏡検のために拾い上げられるレプリカの範囲が広く、それだけ試料作りが楽になる、などの点である。

本法は、その装置を工夫すれば、いわゆるダブル・レプリカと称せられるところの断面の双方の面を対称にとらえる方法も可能になると考えられる。今後の検討にまちたいと思う。

今回の試みは細胞浮遊液についてのみ行なわれたもので、組織片では、金属面で剝離しやすいため良結果が得られていない。さらにいろいろと工夫する必要があるものと思われる。

摘 要

フリーズ・エッチング法において、凍結による氷晶生成をできるだけおさえる目的で、金属板に挟んだ薄層試料を急速に凍結させるいわゆるサンドウィッチ法を試みたところ、冷却速度は大きくなり、できる氷晶は小さくなるのが、赤血球浮遊液を試料としてたしかめられた。また酵母細胞についても、良い結果が得られた。

追 記

本稿を書き上げた後で、京都大学の西占 貢教授より同様のねらいをもって行なわれたサンドウィッチ法が既に発表されているとの示唆をうけた。すなわち Winkelmann らの業績^{11,12)}であって、彼らの方法によれば、長方形の金属フォイルを直角の位置で重ねて薄層凍結試料を作り、下部のものを固定しておいて上部のものを押し上げることにより、凍結試料の破断を行なっているのであるが、装置の寸法、試料の量、冷却速度、観察所見での従来の結果との比較など、詳細な点についての記載がない。

文 献

- 1) 根井外喜男 1973 凍結法総論. 医学・生物学のための応用電子顕微鏡学, 総論. 医歯薬出版, 東京, 165-171.
- 2) Nei, T. 1966 Freezing and drying in electron microscopy: Observations of microorganisms with newly devised cooling equipment. Proc. Sixth Intern. Congr. Electron Microscopy, Kyoto, 47-48.
- 3) Bachmann, L. and Schmitt, W. W. 1971 Improved cryofixation applicable to freeze-etching. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **68**, 2149-2152.
- 4) 鷲岳 宏・平野 正 1973 Freeze-etching 法. 医学・生物学のための応用電子顕微鏡学, 総論. 医歯薬出版, 東京, 172-189.
- 5) 根井外喜男・松坂理夫・浅田 実 1971 フリーズ・エッチング法における冷却条件の吟味. 低温科学, 生物篇, **29**, 91-105.
- 6) Riehle, U. 1968 Schnellgefrieren organischer Präparate für die Elektronen-Mikroskopie. Chem. Ing. Techn., **40**, 213-218.
- 7) Buchheim, W. 1972 A new technique for improved cryofixation of aqueous solutions. Proc. Vth European Congr. Electron Microscopy, 246-247.
- 8) Nei, T., Kojima, Y. and Hanafusa, N. 1964 Hemolysis and morphological changes of ery-

- throcytes with freezing. *Contrib. Inst. Low Temp. Sci., Ser. B, No. 13*, 1-6.
- 9) Nei, T. 1965 Formation of cracks in the freeze-drying of albumin solutions. *Biodynamica*, **9**, 277-282.
 - 10) MacKenzie, A. P. and Luyet, B. J. 1962 A collodion sandwich-film technique for the study of ice in very thin layers of aqueous solutions. *Proc. Fifth Intern. Congr. Electron Microscopy, Philadelphia*, P-2.
 - 11) Winkelmann, H. and Meyer, H. W. 1968 A routine freeze-etching technique of high effectivity by simple technical means. Part I. The principle. *Exp. Path.* **2**, 277-280.
 - 12) Winkelmann, H. und Wammetsberger, S. 1969 Eine mit einfachen Mitteln durchführbare Routinegefrierätztechnik hoher Effektivität. Teil II. Die technische Anordnung. *Exp. Path.*, **3**, 113-116.

Summary

A "sandwich method" was employed to obtain a possibly higher rate of cooling in the freeze-etching procedure. A small amount of cell suspensions, approximately 0.003 ml, was placed on a specially designed specimen holder made of a copper plate which was then covered with a second, thinner copper plate. When the extremely thin-layered prepared specimen was immersed in Freon 22 maintained at -150°C , a high rate of cooling, approximately $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, was obtained. This frozen specimen was then transferred onto the cold stage in the freeze-etching apparatus and cleaved by quick removal of the cover copper plate under sufficient low temperature and vacuum conditions. Etching and replication were then conducted by following the ordinary method.

From the results of observation of yeast and red blood cells, it was ascertained that good specimens with less artifacts could be obtained by the present "sandwich method".

図 版 説 明

1. 10% グリセリン加赤血球, 液滴法, 細胞はやや収縮し, 細胞周囲の氷晶はかなり大きい
×6,000
2. 10% グリセリン加赤血球, サンドウィッチ法, 細胞内外の氷晶は1のものより小さい
×6,000
3. 20% グリセリン加赤血球, 液滴法, 細胞内外の氷晶はほぼ2のものに等しい ×6,000
4. 20% グリセリン加赤血球, サンドウィッチ法, 細胞の形態は正常で, 内外にほとんど氷晶をみ
とめない ×6,000
5. 30% グリセリン加赤血球, 液滴法, 所見はほぼ4のものに等しい ×6,000
6. 20% グリセリン加酵母細胞, *Saccharomyces cerevisiae*, サンドウィッチ法 ×16,000

