



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	生物試料の生の状態の電子顕微鏡的研究 : 走査型電子顕微鏡による凍結試料の直接観察
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 四本, 晴夫 他
Citation	低温科学. 生物篇, 31, 73-78
Issue Date	1974-01-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17809
Type	departmental bulletin paper
File Information	31_p73-78.pdf



生物試料の生の状態の電子顕微鏡的研究

走査型電子顕微鏡による凍結試料の直接観察^{1-3)*}

根井外喜男

(低温科学研究所)

四本晴夫・長谷川与一・長沢勇二

(日本電子株式会社)

(昭和48年7月受理)

I. 緒 言

従来、生物試料を電子顕微鏡で観察するためには、予め試料を乾燥することが必要であった。試料を試料室内に入れると、高真空にさらされて水がとられてしまうからである。したがって、水をもったままの試料を観察することは不可能であった。この点は電子顕微鏡と光学顕微鏡の根本的な差違のひとつにもなっている。さらに生物試料の超薄切片を作るためには、固定、脱水、包埋、薄切、染色など一連の物理的・化学的操作が加えられるので、いっそう artefact の生ずるおそれが多くなる。このようなことから、生物試料の乾燥しない水をもったままの生の姿を電子顕微鏡で見ることができないだろうかという希望は、この分野の多くの研究者が永年いだいていたわけである。

著者の1人根井も、早くから本問題に関心をもち、凍結法を利用することをもくろんでいた。すなわち、日本で初めて電子顕微鏡用の試料冷却装置が考案された当初から、その導入を思いたち、いろいろと工夫をかさねた。その結果、凍結細胞をみることができたとはいえ、水をもつ限り細胞の内部の微細構造の観察は困難であることを知った⁴⁾。さらに超高压電子顕微鏡を利用することによって、この透過性の不足を補なうことをねらったが、種々技術的な難点があってもまだ成功するには至っていない。

いっぽう生物試料の含水状態の観察のために、直接観察ではないが間接法として考案されたフリーズ・エッチング法は、その簡便さと有利な点が一般に認識されるや、近年爆発的に応用の範囲が拡大されるようになってきた。従来の凍結乾燥法や凍結置換法よりも、さらに低い温度で操作すること、しかも脱水することなくレプリカを作ることなど、artefact の可能性が一層少ないわけである。また細胞膜の剝離面や立体像がよく現われるという特徴もある。しかし、いずれにしても、試料断面のレプリカ像であるから、ものの影をみているようなもので、しばしば像の解釈に苦しむことがある。また、組織化学あるいはオートラジオグラフのような

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1255号

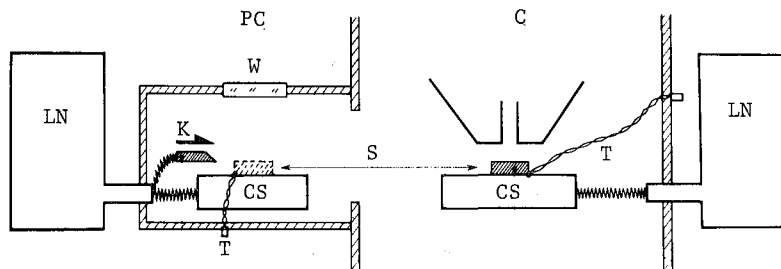
試料自身についての検索のできないという基本的な欠点もある。

これらの点に鑑みて、根井はかねてから、厚い試料でもそのまま観察できる走査型電子顕微鏡の利用を考えていたが、本装置によるばあいでも、従来はやはり試料の乾燥が必要でありしかも乾燥後金の蒸着を行なうのが通例となっていた。そこでまず凍結乾燥試料についての検討を行っていた⁵⁾が、たまたま Cross の報告⁶⁾をみて、氷そのものを無蒸着のまま走査型電子顕微鏡で観察できることを知り、生物試料であっても、これを凍結すれば無蒸着のままみることができるとはならないかと考えた。含水試料でも、 -100°C より低い温度に凍結しておけば、電子顕微鏡鏡体の試料室中の真空にあっても昇華のおきないことは、既に経験済みであったからである。そこで早速、日本電子の技術陣に協力を求め、実験を試みたところ、意外に容易に凍結試料の観察できることがわかった。実験の結果、2, 3の試料についての成果が得られたので速かに公表しようとしていたちょうどその折に、同じ年(1970年)の少し前に開催された国際会議で同様の意図による実験報告(Echlin)⁷⁾のあることを知らされた。僅かのところでわれわれは立ち遅れになったわけである。priorityを失なった以上、二番煎じの発表では意味がないと考えて、われわれは新しい手段への開発を試みた。これが試料の凍結破断法であり、単に表面構造の観察のみではなく、試料の内部構造の観察をもねらったものである。当時、われわれは、凍結法中の一つとして前述のようにフリーズ・エッチング法の検討を平行して行っていたので、それからヒントを得たのである。

II. 実験方法

装置：既製の走査型電子顕微鏡の試料冷却装置の外に、新たに予備排気室に備える冷却装置および破断面を作るための冷却ナイフを考案作製した(第1図)。

試料台には、やや曲げた小さな鋭利な針が熔接してある。試料は、凍結破断の際に試料台から離れぬよう最初からこの針に刺しておく。



第1図 走査型電子顕微鏡鏡体内および予備排気室の冷却装置

C: 鏡体, PC: 予備排気室, LN: 液体窒素貯槽, S: 試料
CS: 冷却台, W: 窓, K: ナイフ, T: 熱電対

方法：試料を試料台にとりつけ、予め液体窒素で -150°C まで冷却したフロン中に急速に挿入して、凍結させる。それをできるだけ速かに予備排気室に入れて排気する。真空に達した後、鏡体内の試料室の冷却装置上に移して観察するのである。

凍結後装置内に移す過程で空気中にさらされると、水蒸気が凝結して霜となり試料表面を

覆うので、このときは試料温度を -90°C くらいまで上げて霜を昇華させる。別に考案した特殊試料台を用いて液体窒素で試料表面を覆うか、カバー付のものを使用すれば、この霜の凝結は防御できる。霜のない状態で表面を観察した後、試料をいったん予備排気室の冷却台に戻しここで冷却ナイフを用いて破断面を作る。それを再び試料室に移して、新たに作った破断面の観察をする。この破断は何回でもくりかえすことができる。

試料：動物性試料として、マウスおよびハムスターの舌、ショウジョウ蠅の幼虫、植物性試料として、キクの花弁を用いた。

観察：日本電子製走査型顕微鏡 U-3 を使い、加速電圧 5 kV で写真撮影を行なった。

なおグルタル・アルデヒドによる固定、グリセリンなど凍害防止剤の添加などについての検討を行なった。

III. 結 果

1. 動物性試料

1) ハムスターの舌(一部マウスの舌)：特に糸状乳頭に注目したが、本凍結法によるもの(図版 I-a b)と、従来の空気乾燥、金蒸着によるものとの差を確認するまでに至らなかった。乳頭の凍結断面では、年輪様の輪状構造(図版 I-2 a)が、さらに深部内層の断面では、筋肉層と思われる層状あるいは線維様構造の横断面と縦断面がみとめられた(図版 I-2 b)。

2) ショウジョウ蠅幼虫：空気乾燥では、収縮変形がみとめられる(図版 I-3 a)のに対し、凍結法によるものは、変形がなく充実した感じの外観を呈している(図版 I-3 b)。凍結断面で、虫体内部構造がよく観察された(図版 II-4 a b)。倍率の低いばあいは問題はないが、1,000 倍近くの倍率になると、各所に蜂の巣様、あるいは海綿様の微細構造がみとめられるが、これはおそらく凍結に際して生成された氷晶の抜け跡であろうと想像される。

このような artefact を避けるため、フリーズ・エッチング法で賞用されているグリセリンの添加を試みたが、あまりよい結果は得られなかった。試料表面の微細構造が不鮮明になるばかりでなく、凍結断面の内部構造の観察にも不適當なようにみえた。今後さらに詳細に検討する予定である。

2. 植物性試料

キクの花弁について観察した結果、表面構造においても、断面での内部構造においても、空気乾燥のものでは収縮変形の像がみられるのに対し、凍結法によるものではそのような所見はみとめられない(図版 II-5 a b, 6 a b)。

IV. 考 察

生物試料を乾燥しないで含水状態のまま観察するということは、透過型電子顕微鏡では技術的難点もあって、必ずしも成功したとはいえないが⁴⁾、走査型電子顕微鏡では凍結法を用いることによってほぼ目的を達することができた。ただ、このようにして観察されたものが、果して真に生の状態そのままを示しているかどうか疑問は残るが、光学顕微鏡で観察できる範囲のものについて比較検討した結果からみても、凍結法によるものは、脱水乾燥したものより

はるかに生に近いものであるということ是可以する。

問題は、凍結自身による artefact, すなわち氷晶形成がどこまで防止できるかという点にある。-150°C のフロンでの急速凍結であるから、表層の観察には支障はないとしても、数ミリ立方の試料となれば、当然内部は凍結速度が遅くなるので、大きな氷晶の形成されるおそれがある。それを避けるために予め凍害防止剤として知られているグリセリンの添加も試みられたが、結果は芳しくなく、氷晶の形成はおさえても、かえって微細構造が不鮮明になるという欠点が現われてきた。グルタル・アルデハイドその他の固定剤を用いることは、良好な像を得るのに役立つようであるが、固定剤自身による artefact の有無もよく吟味しなければならない。このように試料作製法に関しては今後さらに検討を重ねる必要がある。

またいっぽう装置自身についても、種々の試料に適するような試料台、試料室に持ちこむまでの間の着霜防止法、任意の部位を自由に切断する方法、分解能を上げるための工夫など、改良すべき点が少なくない。

近年、電子顕微鏡学において、生物試料の含水状態の観察ということが、多くの研究者の関心をひくようになってきた、その目的をはたすためにいろいろな工夫が試みられているが、いわゆるカプセル法⁹⁾といわれるような常圧下の空間に試料を入れる方法がまだ完成していない今日、凍結法がこの目的を達する唯一無二の方法となっている。その凍結法にも直接法と間接法の二つがあり、これまでは間接法であるフリーズ・エッチング法が多く用いられてきた。凍結試料の直接観察は、走査型電子顕微鏡を使用することによって初めて容易になったわけであるが、走査型電子顕微鏡には、焦点深度の深い立体像の得られるというメリットがある反面分解能が低いというデメリットもある。したがって、透過型、走査型それぞれの電子顕微鏡の特徴を生かして、含水試料の観察を行なうためには、凍結法に対する工夫を、今後さらに一段とたかめて行かなければならない。

V. 要 約

含水生物試料の電子顕微鏡的観察をねらい、凍結試料の走査型電子顕微鏡による直接観察を試み、従来の乾燥蒸着による標本にくらべて、より生に近いと思われる像を得た。

文 献

- 1) Nei, T., Yotsumoto, H., Hasegawa, Y. and Nagasawa, Y. 1971 Direct observation of frozen specimens with a scanning electron microscope. *J. Electron Microscopy*, **20**, 202-203.
- 2) Nei, T., Yotsumoto, H., Hasegawa, Y. and Nagasawa, Y. 1972 Electron microscopic observation of biological specimens in their native state by employing cryogenic techniques. Proc. Fifth Europ. Congr. Electron Microscopy. 252-253. and 30th Ann. Proc. Electron Microscopy Soc. Amer.
- 3) Nei, T., Yotsumoto, H., Hasegawa, Y. and Nagasawa, Y. 1973 Direct observation of frozen specimens with a scanning electron microscope. *J. Electron Microscopy*, **22**, 183-188.
- 4) 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.
- 5) 根井外喜男 1968 走査電子顕微鏡による凍結乾燥試料の形態的観察. 低温科学, 生物篇, **26**, 99-104.
- 6) Cross, J. D. 1969 Study of the surface of ice with a scanning electron microscope. *In*

- Physics of Ice. (N. Riehl, B. Bullemer and H. Engelhardt, *ed.*) Plenum Press, N. Y. p. 81-94.
- 7) Echlin, P., Paden, R., Dronzek, B. and Wayte, R. 1970 Scanning electron microscopy of labile biological material maintained under controlled conditions. Scanning Electron Microscopy/1970, Proc. IIIrd Ann. Scanning Electron Microscope Symposium, IIT Res. Inst. Chicago, 51-56.
 - 8) Nagata, F. and Ishikawa, I. 1972 Observation of wet biological materials in a high voltage electron microscope. *Jap. J. Appl. Phys.*, **11**, 1239-1244.

Summary

In order to observe biological specimens in their native state, that is, still containing their water, cryotechniques have been used in electron microscopy.

Using a recently developed cold stage for installation in the pre-evacuation chamber of a scanning electron microscope, we have succeeded in observing a biological specimen in its frozen state without the need for such conventional specimen preparation as drying and metallic vacuum evaporation and also succeeded in the direct observation of the fractured surface of the frozen specimen.

As the results of the observation of the surface topographies and inner structures of animal tongues, insect larvae and chrysanthemum petals, such changes of the structures as shrinkage by drying, compression and damage by fracturing were not in evidence and the image appeared to be those of the specimen in its native state.

図 版 説 明

図 版 I

- 1 a: ハムスターの糸状乳頭, 霜の附着した状態 ×65
1 b: 同, 霜の昇華した後 ×65
2 a: 同, 乳頭の断面 ×200
2 b: 同, 深層断面 ×200
3 a: ショウジョウ蠅幼虫, 頭部, 空気乾燥, 金蒸着 ×150
3 b: 同, 凍結法 ×150

図 版 II

- 4 a: ショウジョウ蠅幼虫, 凍結断面 ×65
4 b: 同, 拡大像 ×650
5 a: キクの花弁, 空気乾燥, 金蒸着 ×300
5 b: 同, 凍結法 ×300
6 a: 同, 空气中切断, 乾燥, 金蒸着 ×650
6 b: 同, 凍結破断 ×200

