



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	低温走査電子顕微鏡法における凍結法の吟味
Author(s)	藤川, 清三; FUJIKAWA, Seizo; 根井, 外喜男 他
Citation	低温科学. 生物篇, 34, 35-42
Issue Date	1977-03-15
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17826">https://hdl.handle.net/2115/17826</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	34_p35-42.pdf



## 低温走査電子顕微鏡法における凍結法の吟味\*

藤川 清三・根井外喜男

(低温科学研究所)

(昭和51年10月受理)

### I. 緒 言

Cross<sup>1)</sup> が走査電子顕微鏡で氷そのものを直接観察したという報告をして以来、生物試料を生のまま凍結してその構造を走査電顕で観察しようという試みが Echlin の一派<sup>2-4)</sup> ならびに根井ら<sup>5-7)</sup> によりなされてきた。最初の実験<sup>2,5)</sup> は走査電顕に冷却試料台をとりつけただけの簡単な装置で行なわれたが、その後生物試料の観察に都合がよいように種々の付属装置が考案されている<sup>3,4,6,7)</sup>。このような低温装置を装備した走査電顕は低温走査電子顕微鏡 (Cryo-SEM) と称され、これにより水を含んだままの試料の微細な構造を電子顕微鏡レベルで直接観察することができるようになった。

Cryo-SEM 法では生物試料に含まれている水を物理的に氷という状態に変え、しかも超低温にすることによってはじめて高真空中に保たれた鏡筒内で、試料を脱水等の生じない安定した状態で観察できるわけである。したがって試料を凍結する段階で生ずる氷晶によるアーティファクトをいかに防止するかが重要である。氷晶の形成によってあらたにアーティファクトが生じたのでは、脱水等による変化のない試料本来の生に近い構造を観察しようという本法の本来の目的がかなわないことになる。

電顕用の試料作成法としての凍結技法において、とくに本法と同様に凍結・含水状態の構造をあらわすフリーズ・レプリカ法では、氷晶の形成を防止するために凍害防止剤として知られているグリセリン等の溶液で試料を前処理することが最も実用的で有効な手段として知られている。ところが Cryo-SEM 法では凍害防止剤で前処理した試料からは満足できる結果が得られていない。Echlin<sup>3)</sup> は「グリセリン等の凍害防止剤で処理をした試料を Cryo-SEM 内で操作すると、操作中に試料に含まれる凍害防止剤が変化を起し、著しく試料面を汚染する」と記している。

このように Cryo-SEM 法ではフリーズ・レプリカ法で用いられている凍結技法をそのまま用いることはできず、一般に凍結は無処理のままの試料を冷却したフレオン (-160°C) に投入することによりなされていたために<sup>2,5)</sup>、氷晶の形成による試料のアーティファクトはさけられなかった。このため、あらたに Cryo-SEM 法のための独自のあるいは応用が可能な凍結法の検討が急がれるわけである。本実験はこの点に関する吟味を行なうことを目的とし、とくに、固定法、冷却法およびグリセリンの使用法等について検討されたものである。

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第1814号

## II. 材料と方法

**材料：** ヒト赤血球，ウサギ腎，木本植物二次木部を材料として用いた。

**装置：** 予備排気室に試料冷却台，冷却メスまたはピン，エッチング用ヒーター，蒸着装置，そして鏡筒内に冷却試料台を備えた走査電子顕微鏡 (JSM-50 A) を用いた。装置の詳細については文献<sup>9)</sup>を参照されたい。

**試料の前処理：** (1) 固定，赤血球は全血を生理食塩水で3回洗ったものを2% グルタルアルデヒド溶液で1時間固定した。組織試料は約  $1.5 \times 1.5 \times 3$  mm の大きさに切りだした細片について以下のような種々の固定液で各1時間づつ固定した。A, 1.5, 2, 2.5そして4% グルタルアルデヒド溶液 B, 1そして2% オスミウム酸溶液 C, 2そして5% 過マンガン酸カリウム溶液 D, 各濃度のグルタルアルデヒド溶液と1% オスミウム酸溶液による二重固定。

(2) グリセリン処理，2% グルタルアルデヒド溶液で固定した各試料を，20そして30% グリセリン溶液 (v/v) 中に1~2時間浸漬させた。

(3) この他に各試料ともに無処理の新鮮な材料を用いた。

**凍結法：** (1) 各種固定処理した試料，そして無処理の試料を組織はその細片 (約  $1.5 \times 1.5 \times 3$  mm) を，赤血球は約 0.01 ml をそれぞれ銅製の試料台上にとり，種々の冷却速度 (約  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ °C/min) で最終的に  $-196$ °C まで冷却させた。

(2) 固定後，グリセリン処理した試料は予め液体窒素で冷却したフレオン 22 ( $-160$ °C) 中に急速に投入して凍結させた (冷却速度，約  $10^4$ °C/min)。

(3) 新鮮なヒト全血を予め液体窒素で冷却した銅板上にネブライザーで噴霧し凍結させた<sup>9)</sup>。試料台をときどき液体窒素中につけ，温度上昇をさけながらメスによる破断が可能な高さ (約 2 mm) になるまで噴霧を続けた。また，一部の試料については，噴霧後の表面に  $-85$ °C に冷却したブチルベンゼン<sup>10)</sup> をかけ，さらに薄い金属板で押さえつけてから液体窒素で再び冷却を行なった。破断はこの金属板をはね上げることによりなされた。

(4) ヒト全血の 0.003 ml を2枚の薄い金属の板でサンドイッチ式薄層<sup>11)</sup>にしたものを冷却したフレオン中で凍結させた。なおこの方法はすでに根井ら<sup>9)</sup>により Cryo-SEM 法に使用されている。

**Cryo-SEM 法：** 以上のように凍結した試料を走査電顕内に移し，破断，エッチング，金蒸着 (Freeze-etching SEM 法)<sup>7)</sup> した後に，加速電圧 15 kV で観察を行なった。なお一部の試料についてはエッチング，あるいは蒸着操作を省いた。温度測定は凍結試料台にとりつけた熱電対温度計によりなされた。

## III. 結 果

**固定試料における氷晶形成：** 種々の固定処理を行なった試料をそれぞれ異なった冷却速度で凍結させて，細胞内に形成された氷晶の大きさ，そしてそれによる構造の変化を無固定のままこれも各冷却速度により凍結させた試料と比較を行なった。その結果，組織試料では固定した試料においても無固定のものとでなんらの差異も認められなかった。また，固定液の濃度，種

類の違いによる差異も認められなかった。両試料ともに緩慢凍結したものは急速凍結したものに比べて大きな氷晶が形成されていたが、氷晶の大きさはこの他に試料の種類によっても、あるいは同一試料内でも部分的にかなりの違いが認められた (図版 I-1 図)。

一方、赤血球に関してはすでによく知られているように<sup>12,13)</sup> 無処理のまま緩慢凍結 (約 10°C/min) させたものでは細胞内に氷晶は形成されないが、その全体の形は脱水により収縮変形される。急速凍結 (約 10<sup>4</sup>°C/min) ではその外形は保たれているが細胞内には走査電顕でも十分に認めうる大きさの氷晶が形成される。ところが固定した血球では緩慢 (図版 I-2 図)、急速 (図版 I-3 図) 両凍結においても細胞の外形が保たれているとともに認め得る大きさの氷晶は形成されていなかった。

**スプレー法、サンドイッチ法の Cryo-SEM への応用：** 無処理のままスプレー法で凍結させた血球ではその内部に認めうる大きさの氷晶は形成されなかった。フリーズ・レプリカ法において明らかにされているスプレー法による凍結の有効性は原著<sup>9,10)</sup> にゆずるとして、スプレー法を Cryo-SEM 法に応用したとき、噴霧した小滴を直接メスにより、あるいはブチルベンゼンで包埋後破断すると、その破断面の多くが噴霧されたときの各小滴間で生じ (図版 I-4 図)、小滴の内部で破断される割合が極度に低いという欠点がみいだされた。

一方、サンドイッチ法では氷晶はスプレー法で得られたものに比べかなり大きいですが、走査電顕での観察において支障のある程度ではなかった。広い破断面がコンスタントに得られるという利点がみられた (図版 I-5 図)。

**グリセリン処理した試料の SEM 像：** グリセリンが氷晶の形成を妨げる効果をもつことはよく知られた事実であり、本実験での問題はグリセリン処理した試料を走査電顕内でどのような条件のもとで操作したならばグリセリンの変化によるアーティファクトをさけられるかということである。モデル実験として 30% グリセリン水溶液を約 0.01 ml 銅板上にとり、これを直接液体窒素中に投入して凍結させた試料を用いた。このようにして作られた試料をエッチングすると氷の昇華によりグリセリンが縞状に分布したパターンがあらわれてくる。

種々の温度でエッチングを行なった試料をビームによる表面温度の上昇をさけるためすみやかに観察して、グリセリンの変化を調べた。その結果、 $1 \times 10^{-5}$  torr の真空度の鏡筒内においては、試料台温度が -100°C より少し高くなるあたりから氷の昇華が始まるが、-95°C 付近まではグリセリンの部分には変化が生じないことが明らかになった。ところが -95°C 付近をさかいとして、それ以上の温度でエッチングを行なった試料では縞状に分布したグリセリンの破断部が丸味を帯び、溶けたような状態を示し始めていた。

また、同じように作った試料を破断後直ちに鏡筒の試料台に移し、徐々に試料台を加熱させて試料に昇華をおこさせ、その過程を連続して二次電子像として観察することを試みた。この方法では試料表面の温度はビームの照射によっても上昇するために試料台温度が -100°C 付近になり、グリセリンの部分が氷の部分と区別できるようになったときは、すでにグリセリンは溶けたような状態を示していた。

以上のようなモデル実験での知見をふまえたうえで実際にグリセリンで処理をした生物試料について実験を行なった。

破断後全くエッチングをせずに  $-150^{\circ}\text{C}$  に保ったまま観察を行なった試料ではグリセリンは観察の障害になるような変化を起こさなかったが、エッチングをしないと細胞の構造ははっきりしなかった(図版 I-6 図)。エッチングを  $-95^{\circ}\text{C}$  以上の温度で行ない、その後再び  $-150^{\circ}\text{C}$  付近まで冷却後観察を行なった試料では、明らかにグリセリンの変化による汚染が生じており、微細構造は不明瞭になっていた(図版 II-7 図)。一方、エッチングを  $-100\sim-95^{\circ}\text{C}$  の間の温度で行なったとしても再び試料を十分に冷却( $-150^{\circ}\text{C}$  付近まで)しないで観察を行なうと、グリセリンは初めのうちは変化を起こさなかったが観察を続けているうちに著しい変化を起こした。これにより、金の蒸着層にヒビが入ったり(図版 II-8 図)、高倍率での観察中に試料面のグリセリン層が変化して著しい凹凸状を示したりした(図版 II-9 図)。

エッチングを  $-100\sim-95^{\circ}\text{C}$  の温度で行ない再び  $-150^{\circ}\text{C}$  付近まで冷却した試料ではグリセリンの変化によるアーティファクトはみられなかった。図版 II-10, 11, 12 図はこのように操作した試料から得られた写真であり、エッチングにより微細な構造が明らかになっており、しかもグリセリンによるアーティファクトは全く生じていない。なお、 $-150^{\circ}\text{C}$  付近まで冷却した試料は約 1 時間の観察に耐えた。

#### IV. 考 察

電子顕微鏡により凍結・含水状態の生物試料の構造を観察しようというときに、生物試料中に含まれている水を、氷晶の形成による形態的なアーティファクトを生じさせないほどの急速度で冷却させることはかなり困難である。スプレー法<sup>9,10</sup>、サンドイッチ法<sup>11</sup>は試料を小滴状、あるいは薄層状に小さくすることにより冷却速度を速めて、試料中に形成される氷晶の大きさを小さくさせようという方法であり、特にスプレー法においては電顕レベルで effective vitrification が獲得されている<sup>9,10</sup>。しかしながら、これらの方法は溶液状試料等の一部のものにだけしか応用できないという難点をもっている。また、スプレー法を Cryo-SEM の凍結法として応用する場合は、より広い破断面を作るための破断法の検討が必要であろう。

なお、組織試料を急速凍結させる一方法として Rebhun<sup>14</sup> は有機溶媒あるいは粉状物質により予め試料面を覆ってから凍結させるという方法を示している。凹凸のある試料面を被覆することにより、寒剤に試料を投入した際に表面から生ずるガスの発生をおさえ、直接試料と寒剤を接触させることにより、急速な冷却速度が得られるという。この方法で実際にどの程度まで氷晶の大きさを小さくすることができるかは明らかではないが Cryo-SEM 法の凍結法として検討に値する。

一般に急速な冷却速度が得られない多くの試料については予め試料に前処理を施してから凍結させることにより氷晶の形成によるアーティファクトが防止されている。特にグリセリン等の凍害防止剤による処理が氷晶の形成を妨げることがよく知られている。ところが諸言でも述べたように Cryo-SEM 法では凍害防止剤で処理をした試料からは満足すべき結果が得られておらず、むしろマイナスの面が多いといわれていた<sup>3</sup>。これは Cryo-SEM 法がフリーズ・レプリカ法とは異なり、直接、凍結させた試料面をビームで走査を行ない観察をするためであり、観察中に試料表面の温度が上昇してグリセリンが変化を起こしてしまい試料面を著しく汚

染するためである。エッチングの段階においても温度をあげすぎた場合には同じ現象が生ずる。本実験では試料中のグリセリンが鏡体内（真空度 $1 \times 10^{-5}$  torr）で変化をはじめるときの温度条件に関して吟味を行ない、ビーム走査による温度上昇のおそれがない予備排気室でのエッチング段階では $-95^{\circ}\text{C}$ 以下に温度を保つ限りはグリセリンは変化しないこと、そして観察中においても試料を $-150^{\circ}\text{C}$ 付近に保っておけばグリセリンの変化によるアーティファクトを受けずに、約1時間のあいだ観察が可能であることを明らかにした。

グリセリンで前処理をした試料を実際にCryo-SEMで観察するための簡便な方法として次の手順を提唱する。1) 固定後グリセリン溶液で前処理した試料を銅製の試料台にとりつけ、2) フレオン22 ( $-160^{\circ}\text{C}$ )で急速凍結させ、3) SEMの試料台にとりつけて、鏡体の予備排気室に運ぶ。4) エッチング・ヒーターにより試料面を覆っている霜がとび始めるまで加温する。5) 霜がとび始めたら直ちにコールド・ピンあるいはメスで破断し、予備排気室の冷却試料台に固定する——試料台への固定後、JSM-50Aの低温装置を用いたとき、氷の昇華がとまる温度 ( $1 \times 10^{-5}$  torrの真空度においては $-99^{\circ}\text{C}$ )まで試料が冷却されるのに約30秒かかる。試料のエッチングはこの間に行なわれる。さらに数分保持することにより試料は $-150^{\circ}\text{C}$ 付近まで冷却される——。6) 金により試料面を蒸着した後、7) 鏡筒の試料台に運び観察を行なう。

Cryo-SEMの凍結法としてこの他に固定による試料の前処理自体が氷晶形成の防止に効果があるか否かについて検討を行なった。その結果、そのメカニズムは明らかではないが、一部の試料（赤血球）では固定処理をすることにより氷晶の形成がある程度防止できることが明らかにされた。

また、Cryo-SEM法において、試料の氷晶形成を防止または軽減させる方法として Moorら<sup>15)</sup>により示されている高圧下で試料を凍結させる方法、あるいは Boyde<sup>16)</sup>により示されている1%クロロフォルム溶液による前処理法——クロロフォルムが試料の凍結のさいに、氷晶形成のための核として機能するために試料中の氷晶の数が増え、これによりひいては個々の氷晶の大きさが小さくなるという——等の応用も一考に値するであろう。

Cryo-SEM法は試料を凍結させることにより、水を持ったままの構造を直接、電子顕微鏡により観察できるという画期的な方法である。しかし、凍結のさいに作られる氷晶による形態的なアーティファクトをいかに防止するかが未解決の問題であった。本報告では一定の温度条件さえ保たれたならば、これまではむしろあらたなアーティファクトを生むとされていたグリセリンで前処理を行なった試料の観察が可能であることを実証した。これによりCryo-SEM法では、氷晶形成による形態的なアーティファクトの生じていない、水を持ったままの生物試料を直接観察することが可能になったわけである。

## 摘 要

Cryo-SEM法において、氷晶形成により生ずる試料の形態的なアーティファクトを防止するための方法——スプレー式凍結法、サンドイッチ式凍結法の応用、固定あるいはグリセリンによる前処理——について検討を行なった。特にグリセリンで前処理をした試料からは好結果が得られた。すなわち、SEM内で試料を一定温度 ( $1 \times 10^{-5}$  torrの真空度のもとで、エッチン

グには  $-95^{\circ}\text{C}$  以下の温度, 観察には約  $-150^{\circ}\text{C}$ ) で操作したならば, 試料中のグリセリンの変化によるアーティファクトの生じていない, また, 氷晶形成による形態変化が生じていない鮮明な SEM 像を観察することが可能であった。

## 文 献

- 1) 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, eds.), Plenum Press, N.Y., 81-94.
- 2) Echlin, P., Paden, R., Dronzek, B. and Wayte, R. 1970 Scanning electron microscopy of labile biological material maintained under controlled conditions. *In Scanning Electron Microscopy/1970*, IIT Res. Inst. Chicago, 51-56.
- 3) Echlin, P. 1971 The examination of biological material at low temperatures. *In Scanning Electron Microscopy/1971*, IIT Res. Inst. Chicago, 225-232.
- 4) Echlin, P. and Moreton, R. 1973 The preparation, coating and examination of frozen biological materials in the SEM. *In Scanning Electron Microscopy/1973*, IIT Res. Inst. Chicago, 325-332.
- 5) 根井外喜男・四本晴夫・長谷川与一・長沢勇二 1971 走査型電子顕微鏡による凍結試料の直接観察. *J. Electron Microscopy*, **20**, 202-203.
- 6) 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.
- 7) Nei, T., Yotsumoto, H., Hasegawa, Y. and Hasegawa, M. 1974 Freeze-etching in scanning electron microscopy. *J. Electron Microscopy*, **23**, 137-138.
- 8) 根井外喜男・浅田 実 1975 低温走査電子顕微鏡における一新技法, フリーズ・エッチング・SEM 法. *低温科学, 生物篇*, **33**, 45-52.
- 9) Morioka, H. 1975 A new type of spray-freezing apparatus for biological materials. *J. Electron Microscopy*, **24**, 307-309.
- 10) Bachman, L. and Schmitt, W. W. 1971 Improved cryofixation applicable to freeze etching (spray-freezing/solute model systems/liquid nitrogen and propane). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 2149-2152.
- 11) Nei, T. 1973 An attempt at cryocleavage in the freeze-etching technique. *J. Electron Microscopy*, **22**, 371-373.
- 12) Nei, T., Kojima, Y. and Hanafusa, N. 1964 Hemolysis and morphological changes of erythrocytes with freezing. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **B, 13**, 1-6.
- 13) Nei, T. 1976 Freezing injury to erythrocytes. I. Freezing patterns and post-thaw hemolysis. *Cryobiology*, **13**, 278-286.
- 14) Rebhun, L. I. 1972 Freeze substitution and freeze drying. *In Principles of Electron Microscopy*, Vol. 2. (M. A. Hayat, ed.) Van Nostrand Press, N.Y., 3-42.
- 15) Moor, H. and Riehle, U. 1968 Snap-freezing under high pressure: a new fixation technique for freeze-etching. 4th Europ. Reg. Conf. Electron Microscopy, Rome, **2**, 33-34.
- 16) Boyde, A. 1974 Freezing, freeze-fracturing and freeze-drying in biological specimen preparation for the SEM. *In Scanning Electron Microscopy/1974*, IIT Res. Inst. Chicago, 1043-1046.

### Summary

Application of the spray-freezing or sandwich method, along with pre-treatment by chemical fixatives or glycerol, was investigated as a means of preventing morphological artifacts to ice crystal formation in specimens prepared for the Cryo-scanning electron microscope. Satisfactory results were obtained when glycerinated specimens were kept to certain temperature ranges (lower than  $-95^{\circ}\text{C}$  during etching and near  $-150^{\circ}\text{C}$  during observation). Under these conditions, sharp images without obscuration due to glycerol and without artifacts due to ice crystal formation, could be observed.

## 図版説明

## 図版 I

1 図： ウサギ腎尿管，2% グルタル固定，急速凍結 ( $10^4$ °C/min)，破断，エッチング，金蒸着。細胞内には大小の氷晶が形成された跡がみられる。860×

2 図： ヒト赤血球，2% グルタル固定，緩慢凍結 ( $10^2$ °C/min)，破断，エッチング。固定により緩慢凍結にもかかわらず細胞の外形はよく保たれている。9,000×

3 図： ヒト赤血球，2% グルタル固定，急速凍結，破断，エッチング。破断面においても氷晶形成は認められない。9,000×

4 図： ヒト全血をスプレー式凍結し，プチルベンゼンで包埋後破断した面，エッチング，蒸着。破断は噴霧された各小滴間で生じやすい。□内は破断面にあらわされた赤血球の断面を示す。860×

5 図： ヒト全血，サンドイッチ凍結，剥離後エッチング，蒸着。氷晶はかなり小さく，しかも広い破断面が作られている。2,100×

6 図： ヒト赤血球，2% グルタル固定，20% グリセリン処理，急速凍結，破断，蒸着。エッチングがなされていないために細胞の輪郭さえも不明瞭である。□内は破断された一赤血球の断面を示す。2,100×

## 図版 II

7 図： 木本植物，木部柔細胞の一部，2.5% グルタル固定，30% グリセリン処理，急速凍結，破断， $-95^{\circ}\text{C}$  以上でエッチング，蒸着。(12 図と比べ明らかなように) エッチング中のグリセリンの変化により微細構造は不明瞭となっている。(n) 核。6,200×

8 図： ヒト赤血球，2% グルタル固定，20% グリセリン処理，急速凍結，破断， $-100\sim-95^{\circ}\text{C}$  でエッチング，蒸着，試料温度・約 $-110^{\circ}\text{C}$  で観察。観察中のグリセリンの変化により蒸着層にひびが入っている。2,100×

9 図： ヒト赤血球，処理・観察条件は 8 図とほぼ同じ。10,000 倍で撮影後，同じ部分を倍率を下げて観察を行なった。高倍観察部に凹凸状のアーティファクトが生じている。2,100×

10 図： ヒト赤血球，2% グルタル固定，20% グリセリン処理，急速凍結，破断， $-100\sim-95^{\circ}\text{C}$  でエッチング，蒸着，試料温度・約 $-150^{\circ}\text{C}$  で観察。エッチングにより微細構造がよくあらわれているとともにグリセリンによるアーティファクトは生じていない。2,100×

11 図： ウサギ腎・近位尿管の microvilli，30% グリセリン処理，以下の処理・観察条件は 10 図と同じ。12,200×

12 図： 木本植物・木部柔細胞の一部，処理・観察条件は 11 図と同じ。核 (n) の一部，ミトコンドリア (m) 等の細胞器管がよく保たれている。6,200×



