



## 研究技術紹介

# 海藻類観察のための超薄切片作製技術の基礎

峯 一朗\*

高知大学理学部生物学科 780-8072 高知市曙町 2-5-1

Ichiro Mine 1998: Basic techniques for ultra-thin sectioning for phycological studies. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 46:111-119.

Basic methods for ultra-thin sectioning for phycological studies is described in detail. The aim of the text is to illustrate how to prepare specimens for those who intend to observe the fine structure of seaweed cells by a transmission electron microscope for the first time. The practical methods for preparing thin sections were presented step by step. The text deals with the handling of chemicals, preparation of reagents and how to handle various instruments and useful tips for each stage of specimen preparation, i.e., fixation, embedding, thin sectioning and positive staining are also presented.

*Key Index Words: embedding, fixation, positive staining, seaweeds, thin sectioning, transmission electron microscopy*

### はじめに

細胞の微細構造を観察するために様々な方法があるが、化学固定を施した試料の超薄切片を透過型電子顕微鏡（以下、電顕）で観察することは現在でも最も一般的なもののひとつであろう。この技術紹介では、海藻の細胞を固定して超薄切片を作成し、電子染色する段階までの方法を具体的に述べた。つい数年前まで電顕にさわったこともなかった筆者の生暖かい経験を基に、初心者にとって取り組み易い「実験室ノート」のような内容を目指したつもりだが、残念ながら経験不足による内容の不足は否めない。一方、電顕試料の作成法についてはこれまで多くの優れた解説書が和洋書を問わず出版されているので、詳しくはそれらを参照して頂きたい。なお、この技術解説は1996年春に行われた第2回藻類学春の学校「藻類学における電子顕微鏡技術の初歩」のテキストの一部を抜粋・変更したものである。

### 試料作製の概要

試料作製過程の概略を述べる（フローチャートを図1に示した）。例えばある論文の「材料と方法」では超薄切片試料の作製方法について、次のように書かれている（脚注1）。

「藻体を、前固定液（3% グルタルアルデヒドと2%

NaClを含む0.1 M カコジル酸緩衝液 [pH 7.2]）に漬け、1-3 mm の長さの断片に切り分けて、4℃で2時間置いた。試料を2% NaClを含む緩衝液で洗い、2% 四酸化オスミウムと2% NaClを含む緩衝液で室温で2時間固定した。後固定を施した試料を徐々に濃度を下げた緩衝液で洗い、水で1回洗った後、1% 酢酸ウラニル水溶液中でブロック染色を行った。試料をアセトンで脱水し、Spurr樹脂に浸漬し、70℃で一晩重合することにより包埋を行った。超薄切片をウルトラミクロトームを用いてダイヤモンドナイフで切り出し、フォルムバルを張った単孔グリッドに載せ、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し、電顕で観察した。」

ここに並んでいる専門用語は何を意味しているのだろうか？電顕で超薄切片を観察するためには、試料を薄い切片（普通100 nm以下の厚さ）にして真空中に置かなければならない。そのために、なるべく元の（生きた）細胞構造を「反映」した（決して生きた状態と同じではないが）状態を保つように試料を殺す、すなわち「固定」する必要があり、上の例文のようにアルデヒド系固定剤による前固定と四酸化オスミウムによる後固定との二重固定を行うことが多い。この固定の条件には、固定に使用する試薬（固定剤）の種類、濃

（脚注1）

Mine et al. (1996) Phycol. Res. 44: 185-191 より改変

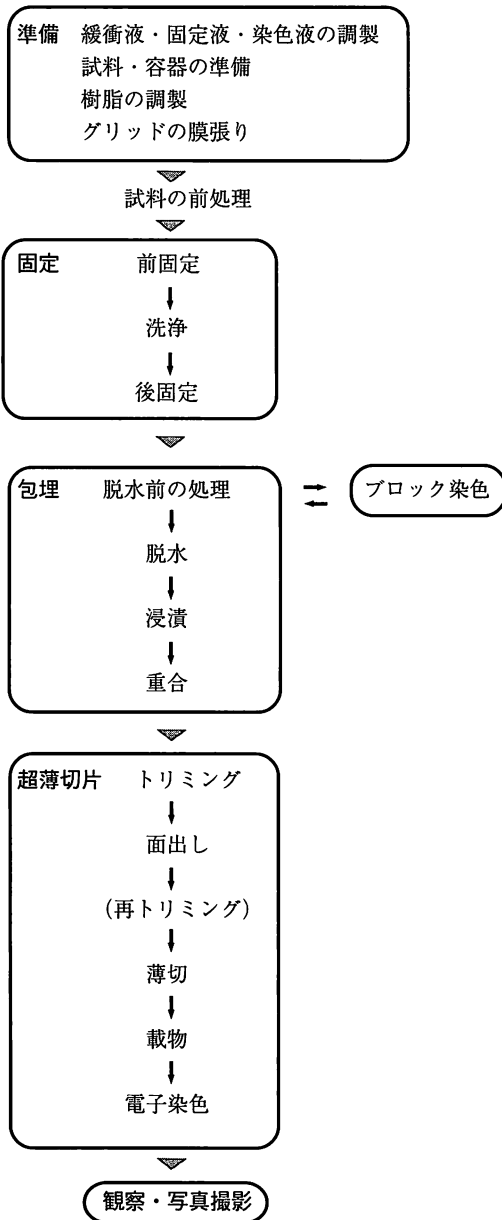


図1. 超薄切片試料作製過程のフローチャート

度、時間、温度、溶媒である緩衝液の種類とその浸透圧など様々な要素が考えられ、それらの組み合わせからなる固定方法は無数のものが考えられる。ある種類の海藻の栄養細胞でうまく細胞内構造が見えた固定方法が、同じ海藻の生殖細胞をうまく固定できるとは限らない。良い電顕像を得るために過去の成功例を参考にして幾通りかの方法を試みる必要がある。

固定を終えた試料は薄い切片をつくるためにある程度の硬さを持った樹脂の中に埋め込まれる。この処理は「包埋」と呼ばれている。樹脂は初めに重合していない単量体として試料に導入される（＝「浸漬」）。樹脂の単量体は水に難溶だが有機溶媒には溶けるので、浸漬の前に試料に含まれる水を有機溶媒に置換しておく（＝「脱水」）。試料を浸漬した樹脂の単量体は試料と共に重合され、試料が埋め込まれた樹脂のかたまりができて上がる。このかたまりをここでは「試料ブロック」と呼ぶ。試料ブロックは目的の部分が切り出されやすいようにトリミングした後、ホルダーが一回転する度に試料を数十 nm ずつ送り出すウルトラマイクローム（以下、マイクローム）という装置に取り付けられる。マイクロームには試料に対してダイヤモンドナイフが固定されており、回転する度に少しずつ近づいてくる試料からその分の厚さの切片が剥ぎ取られる（＝「薄切」）。剥ぎ取られた切片はナイフの刃の直後に湛えられた水のプール（「ポット」という）に、連続したリボンとして浮かべられる。この超薄切片のリボンを金属製の単孔グリッド（孔のあいた金属の薄い円盤；格子状のグリッドもある）に薄いプラスチックのフィルムを張ったものの上にすくい取り（＝「載物」）、電子密度の高い物質（金属）の溶液で染色（＝「電子染色」）したあと、電顕で観察する。

超薄切片試料の作製はおよそこのような手順で行われる。次に試料作製に当たってあらかじめ準備すること、および各手順の具体的な方法と注意点について述べる。

## 準備

### [試薬]

**pH緩衝剤**：固定剤の固定効果は溶液のpHに依存するとされているので、固定液はpH緩衝能のある塩の水溶液を用いる。カコジル酸やリン酸緩衝液あるいはTrisやGood's buffer (Hepesなど)を用いる例があり、緩衝剤の種類によって試料の固定効果が大きく異なることがある。また、固定剤を溶解するとpHが大きく変わる場合があるので、固定に適したpH範囲内に抑えられる程度の緩衝剤の濃度が必要である。

1. カコジル酸緩衝液 カコジル酸ナトリウム 0.05-0.1 M の濃度、pH 5.0-7.4 で用いられる。筆者はあらかじめ塩酸でpHを合わせた2倍濃度の緩衝液を室温で保存して適宜希釈して用いている。

2. リン酸緩衝液 種々のリン酸塩の組み合わせによる緩衝液が知られているが、0.1 M 程度の濃度で用いられている。

3. 培地など 上記の緩衝液の代わりに、pH緩衝能

のある培地や海水なども電顕固定に使われることがある。海水の場合はいろいろな未知濃度の塩を含んでいるので、固定液に含まれる種々の添加物との沈殿などに対して注意が必要。

**浸透圧調整剤:**緩衝液だけでは浸透圧が足りない場合が多く、固定液・洗浄液の浸透圧を増すために塩化ナトリウムや糖類・糖アルコールなどの浸透圧調整剤を加える。材料が生育している培地と同じ浸透圧が得られればよいとは限らず、例えば、2%のNaClと同程度の浸透圧を与えるシヨ糖濃度は0.53 Mであるが、実際にはその半分以下の濃度でシヨ糖を用いることがある。また、浸透圧調整剤の種類によって得られる電顕像が微妙にあるいは大きく変わる。NaClであれば0.1%、糖類であれば0.01 M刻みで各種濃度の電顕像を比べ、最適濃度を決定する。

**固定剤:**1.アルデヒド系固定剤 アルデヒド基がタンパク質・リン脂質・糖タンパク質に含まれる遊離アミノ基(N末端のアミノ基, Lysのεアミノ基など)などと反応して固定に働くと考えられている。グルタルアルデヒド(GA)は2つのアルデヒド基により生体分子の間を架橋するため、固定能力が高く電顕固定には欠かせない固定剤である。8%-70%の水溶液で市販されている。GA自身の重合による変質は固定能力や固定液の浸透圧に大きく影響するというので、電顕固定用に精製された市販品を用いるが、材料によっては安価なものでも支障がない場合もある。緩衝液で希釈した直後は白色の沈殿を生じことがあるが、5-10分間静置すれば消えるので、その後、固定液として用いる(希釈固定液は用時調製)。フォルムアルデヒド(FA)は1つのアルデヒド基を持つ低分子の固定剤で試料への浸透が早いという利点があるが、固定・分子間架橋の力が弱く、単独で電顕固定に用いられることはまれで、GAを含む固定液に加えて用いられる。市販のFA溶液(35-37%水溶液;いわゆるホルマリン)にはメタノールその他の添加物が入っているので普通は電顕固定に使わない。その代わりFAの縮合体であるパラフォルムアルデヒド(PFA)水溶液を用時調整して用いる(脚注2)。

2.四酸化オスミウム( $\text{OsO}_4$ ) 不飽和脂質やタンパク質を架橋することにより膜などの細胞構造の固定に働くと考えられている。それと共に電子密度の高い重金属として電子染色剤の働きもある。毒性・揮発性が高いため取扱注意。精製した固形物をアンプルに密閉して市販されている。オスミウム溶液瓶という二重の共栓ガラス容器の中に水と既知量の $\text{OsO}_4$ の塊(アンプルに

固着している場合にはアンプルごと)とを入れ一晩4℃で静置して溶かし、固定に用いる濃度の2倍濃度の水溶液を作り4℃に保存しておく。

**脱水剤:**脱水に用いられる有機溶媒はアセトン、エタノール、メタノール、酸化プロピレン、あるいは市販の特別な脱水剤などが用いられる。疎水性のSpurr樹脂を用いる場合、試料に残った少量の水分が樹脂重合の障害となるので、溶媒自体への水分の混入を防がなくてはならない。溶媒に含まれる水分は乾燥させたmolecular sievesや無水硫酸銅を混ぜて静置し、上清を用いることによりある程度取り除くことができる。

**包埋剤:**1.Spurrの樹脂 ERL 4206を10g, DER 736を6g, NSAを26g, DMAEを0.4g混ぜることにより調製する。DERを4g,あるいは8gに変えることにより重合後の樹脂の硬さを硬め、あるいは柔らかめに変えることができる。NSAとDMAEだけを先に混ぜることはできない。よく乾燥させた使い捨て容器に、よく乾燥させた専用の磁石回転子を入れ、計りの上に載せ、ERL, DER, NSAの量を計りながら注いで行き、マグネチックスターで混合液全体をよく混ぜたあと、ピペットでDMAEを計り入れ再度よく混ぜ合わせる。調合後、よく乾燥させた使い捨て容器などに分注し、密閉して-20℃に保存しておく。使用する際には、樹脂表面が結露しないように、密閉したまま室温になじませてから開封して使用する。重合条件:70℃, 8時間以上(Spurrの樹脂の単量体は有毒で、揮発性があり、粘性が高いため取り扱いに注意する-樹脂の調製・試料の包埋の間は手袋を着用し、周りに付かないように注意する/重合前の樹脂、その希釈液の廃液は別に溜めて置き、有機溶媒を飛ばしてから熱重合させる/重合した樹脂も完全に安全ではないのでトリミングなどで出た樹脂くずはすぐに掃除する/樹脂は高温で最もよく揮発するので、重合はドラフト内で行う、など換気を充分に行う)。

2.LR White そのまま使う樹脂単量体として市販されている親水性樹脂。この樹脂を使う場合の脱水はエタノールで行う。重合条件:60℃, 8-24時間。空気中の酸素と遮断して行う。

(脚注2)

5 mLの10%FA溶液を作るには、0.5 gのPFAを約2 mLの水に懸濁し、容器を70-90℃に湯煎し、攪拌しながら水酸化ナトリウム一粒程度(0.1gくらい)を加えPFAを完全に溶解する(このときpHは11以上になっている)。容器を室温まで水冷却し、1-2 N硫酸でpHを5.5-8.0程度に戻したあと水を加えて5 mLにする。アルカリの量を増やせば、この方法で25%くらいまでのPFA溶液が作成できる。

**電子染色剤:**1.酢酸ウラニル ブロック染色と切片の電子染色で用いる。どちらの場合も水溶液あるいは有機溶媒に溶かしたものを用いる。1-5%になるように水、有機溶媒、あるいはその混液（たとえば、50%アセトンや70%メタノール水溶液など）に加え、時々攪拌しながら24-48時間置く。大部分の溶質が溶けたら、遠心分離やメンブランフィルタによって沈殿物を取り除いて4℃に保存する。保存したものを使用するときに沈殿が生じていたら再度取り除いて染色に使用する。

2.クエン酸鉛 切片の電子染色に用いる。硝酸鉛1.33gとクエン酸ナトリウム2水和物1.76gを、前もって8分間煮沸し冷やしておいた30mLの水に加え30分間、間隔をおいてよく混ぜ、乳状の懸濁液を作る。8mLの1N水酸化ナトリウム水溶液を加え、水を加えて50mLにし、クエン酸鉛が完全に溶けて溶液が透明になるまでゆっくり攪拌して保存液とする。染色にはこの原液を0.01N水酸化ナトリウム水溶液で5-1000倍に薄めて用いる。保存液も染色液もプラスチック製の密閉容器に保存する。

#### [器具]

**固定容器:**固定から包埋までの過程で用いる試料容器として、透明である（固定操作は試料の変化を倒立顕微鏡などで確認しながら行う）、密閉できる（固定剤[特にOsO<sub>4</sub>は毒性・揮発性が高い]や脱水溶媒の漏洩を防ぐため）、各種の溶媒に耐性のあるものを用いる。

**樹脂容器:**樹脂は粘性が高く（特にSpurr樹脂は）有害なので、その容器やピペット、浸漬に使用する固定容器などは「樹脂専用器具」にして他の実験器具と別に取り扱う。使用後の器具は、残った樹脂をアセトンで洗い流し（廃液は樹脂廃液と共に保存）、洗剤を薄めた液に一昼夜以上漬けておき、手袋をしてよく洗浄する。洗浄に使うたわし・ブラシなども専用のものにした方が好ましい。また、樹脂の調製・保存・希釈・試料の処理などには使い捨ての容器・器具を使う場合もある。樹脂の調製に100-250mL容のポリエチレンビーカー、樹脂の保存・希釈容器にポリプロピレンチューブ、希釈時の計量・ピペッティングには目盛り付きのポリエチレンピペットなどの使用例が挙げられる。

**モールドと試料台:**樹脂を重合させる容器をモールドという。繰り返し使えるゴム製の板状のもの（包埋板）が市販されているが、使用を重ねると重合した樹脂が貼り付いたりゴムが劣化したりして使えなくなる。ゼラチンカプセルやビームカプセル、エッペンドルフチューブなどを使い捨てのモールドとして使用することもできる。空気（酸素）と遮断する場合は、こ

れらの使い捨てモールドに樹脂を満たして蓋をするか、容器の身の中ほどまで樹脂を入れてミネラルオイルを重層し、まっすぐ立てて重合処理を行う。また、モールドに樹脂だけを入れて重合させたものをあらかじめ作っておき、試料ブロックから目的の部分を切り出したものをくっつける試料台として用いる。

**薄切器具:**試料ホルダ（試料をつけた試料台を保持し、マイクロトームに取り付ける器具）は、マイクロトームに取り付ける軸の中心に穴があいていて光が通るようになっているものが切片作製中の試料観察に便利である。また、竹串の先端に眉毛、まつげを瞬間接着剤で貼り付けたものを切片を取り扱うために用意する。毛の部分が汚れていると切片が貼り付いてしまうので、作った柄付きまつげ（眉毛）は、あらかじめアルコールかアセトンで拭いてきれいにしておく。

**グリッドの準備:**単孔グリッドを洗浄し、切片を支持する薄膜を張る。グリッド数百枚を50mLビーカー中のジクロロエタン約20mLの中に沈め、超音波洗浄器に数分間かける。新しいジクロロエタンに交換して超音波をかける操作を数回繰り返したあと、溶媒をアセトンに代えてさらに超音波処理を2回行う。洗浄を終えたグリッドは清潔な紙の上に一枚ずつ重ならないように並べて乾燥させる。膜はフォルムパールで作る。新品のスライドガラスの一端を持ち、（必要ならば念のためにアセトンで拭いてから）キムワイプで乾拭きをして、もう一方の端から0.5%フォルムパール/酢酸イソアミル（または二塩化エチレン）溶液にスライドガラス全長の6-8割まで漬けて、ゆっくりと一定速度で引き上げ、空気中かデシケータの中で斜めに置いて溶媒を飛ばす。このとき引き上げる速度が早いほど、あるいは乾燥中の角度が大きい（垂直に近い）ほどでき上がる膜の厚さが薄くなる。溶媒が飛んで膜が乾燥したら、きれいなカミソリでフォルムパールのついた部分のスライドガラスの縁に沿って切り込みを入れる。10cm程度の深さの容器に満たした水中に、スライドガラスを膜がついている端からゆっくりと差し入れて、膜がスライドガラス表面から離れて水面上に浮かぶようにする。水面上に浮かんでいる膜の様子は光の反射で観察することができる。膜が銀色から薄い金色を呈し、汚れのない部分に洗浄済みグリッドを互いに重ならないように並べる。膜よりもひと回り大きく切ったパラフィルム（あるいはその裏紙の方がよいという人もいる）を上からかぶせて膜とグリッドを貼り付け静かに引き上げ、膜の付いている側を上にして風乾する。表裏の目印にグリッドの金属部分にマジック

で点を打っておく。

## 試料作製の実際

### [固定]

先にも述べたように、固定にはいろいろな条件の組み合わせが考えられる。固定液の温度もそのひとつで、一般的には、固定剤の浸透・固定効果は「高温>低温」、逆に試料・固定剤の保存は「低温>高温」（ただし、微小管の脱重合など、低温で損なわれ得る構造もある）であると考えることができる。4℃-室温の間で試料に適した固定温度を決める。

試料の前処理：材料を固定液に漬ける前に、固定剤が試料によく浸透するようになるべく小さく切っておく。あまり大きな試料を固定する必要がない（電顕で観察できる試料の大きさは、たとえ単孔グリッド一杯に載せたとしてもせいぜい1 mm 四方、1000 枚の超薄切片の厚さの合計は0.1 mm）ことを考え、例えば2-3 mm 角くらいに小さく切る。このとき観察の対象となる組織・細胞にまで損傷を与えないように注意が必要である。固定液に比較的大きな断片を漬けてしばらく（1-15分間）経った後、固定液中で小さな断片に切り分けるという方法も、特に多核体などの巨大細胞を固定する場合などには有効である。

前固定：固定液は、2-3% GA（+ 1.5-3.0% FA）を緩衝液（適当な浸透圧調整剤を加えたもの）に溶かしたものをを用いる。固定の間、試料を時々あるいは連続して攪拌し固定液がよく行き渡るようにする。固定処理、特に初期の段階では、試料に大きな変化を与えるので、ここでの処理はなるべく穏やかに行うこともよい方法である。例えば、試料が生育していた培地と固定液の混合液でまず処理し、そのあと固定液の割合を増やし、最終的に固定液のみに漬けるようにする。固定処理が終わったら緩衝液で洗浄する。試料の乾燥・変形を避けるため、固定液を全て吸い取らずに少し残し、緩衝液で徐々に希釈するように洗浄していく。これは包埋に至るすべての洗浄・置換操作において留意すべきである。アルデヒドはOsO<sub>4</sub>の還元剤となりうるので前固定後の洗浄は充分に行う。また、OsO<sub>4</sub>はショ糖などの糖類と反応し沈殿するので、これらを浸透圧調整剤として前固定に用いたときは、その後の洗浄で糖濃度を徐々に減らして行き、糖を含まない緩衝液で洗浄したあと後固定を行うようにする。

後固定：洗浄を終えた試料を0.5-2% OsO<sub>4</sub>を含む緩衝液に漬ける。固定液は2倍濃度のOsO<sub>4</sub>水溶液と2倍濃度の緩衝液を1:1に混ぜて作製する。膜構造を強調

するために、OsO<sub>4</sub>に0.8-1.0%のフェリシアン化カリウムを加える場合がある。有毒なOsO<sub>4</sub>の蒸気が漏れないように固定容器は密閉・密封しておき、固定処理の間、時々攪拌する。後固定を終えた試料は黒褐色に変色する。後固定の後も試料を緩衝液でよく洗浄し余分なOsO<sub>4</sub>を除去する。

### [包埋]

緩衝液に含まれる塩類は脱水に用いる有機溶媒存在下で沈殿するので、脱水の前に濃度を徐々に減じた緩衝液で洗浄し（例えば、75-50-25%；各10-20分間）、最終的に水で洗浄しておく。

脱水：水で置換した試料を、徐々に有機溶媒の濃度を上げた有機溶媒：水混液に漬けて行き（例えば、30-50-70-80-90-95%；各15-30分間）、最終的に100%の有機溶媒中に漬ける。脱水に使う溶媒によって電顕像が異なる場合がある。また、脱水に使う溶媒は水とよく混ざるものでなければならぬが、樹脂の単量体を溶かす溶媒が水とあまり混ざらない場合は、水とも樹脂を溶かす溶媒ともよく混ざる溶媒で一度脱水した後、樹脂を溶かす溶媒に置換して行くという方法が用いられる。

湿気対策：試料中の水分は疎水性の樹脂の重合の大きな障害となるのでSpurrの樹脂などを使うときには脱水を徹底する。100%有機溶媒に置換した以降の操作では、容器・ピペットはあらかじめ60-70℃のオープンなどで十分に乾燥させたものをを用いるようにする。特に湿気の多い時期には空気中からの水分の混入も問題となるので、樹脂浸漬中の試料容器、樹脂容器、ピペットは全てデシケータの中に入れておき、空気中の湿気の混入を最小限にする。試料容器に5 mL容のサンプル管瓶を使っている場合は、容器の蓋を開け、35 mm 写真フィルムのプラスチックケースの底にシリカゲル粒を敷いた上に置いてケースの蓋を閉め乾燥した密閉容器とすることもできる。

浸漬：有機溶媒で置換した試料を、徐々に樹脂単量体の割合を上げた樹脂と有機溶媒の混液に漬けて行き（例えば、1:3-1:1-3:1；各30分間）、最終的に100%の樹脂中に漬ける。樹脂単量体溶液は緩衝液・有機溶媒などに比べ粘性が高く、試料への浸透に時間がかかるので、各段階での処理時間は洗浄・脱水よりは長く設定し、100%樹脂に換えた後は一晚以上2-3回樹脂を交換する。浸漬の各段階では試料を連続的にゆっくり攪拌する。攪拌には回転軸を傾斜させて試料を回転させる装置を用いることが多い。分厚い密な組織や、細胞壁の特性により樹脂がなかなか浸透せず、切片がそこで分離したり、電顕像に空白を生ずることがある。試

料をより細かく切っておく、樹脂の浸漬をより長時間かけて、吸引瓶中などを使い減圧下で行う、などにより樹脂の浸透が徹底される場合もある。

**重合:**樹脂単量体の浸漬を終えた試料は、モールドに入れて、各樹脂の重合条件に合わせて重合する。水分の混入を防ぐためにモールドもあらかじめ60-70℃で充分乾燥させてから使うようにする。カバーガラスに貼り付いた発芽体などの試料の重合のためには、試料台などを平らに削りその上に試料を下にして軽く押し付けて重合させる(図2)。重合させた後、液体窒素に入れたり、カバーガラス側をドライアイスに押し付けたりしてカバーガラスだけをははずすと平たい面に試料がすぐ出ている試料ブロックを得ることができる。[ブロック染色]

試料を金属で染色するためには、後固定におけるOsO<sub>4</sub>処理と、切片を金属塩溶液で染色する方法の他に、ブロック染色という方法がある。染色は0.5-2.0%の酢酸ウラニルで行う。後固定した試料を脱水する前、緩衝液から水に置換したところで酢酸ウラニルの水溶液に試料を漬け20分-24時間程度置き染色し、再び水で洗って脱水処理を行う。あるいは脱水の途中で有機溶媒と水の混液に溶かした酢酸ウラニルで染色する(例えば、50%アセトン処理のあと酢酸ウラニル/70%メタノール溶液に5分-2時間程度置き、再び70%アセトンから脱水を続ける)。後者の方が染色効果は高いようだが、試料が傷んで微細構造が失われることもある。

[超薄切片(薄切)]

**トリミング:**重合を終えた試料ブロックを実体顕微鏡で観察し、試料のあるところをマジックなどで印を付け、その部分をニッパーやカミソリで切り出す。樹

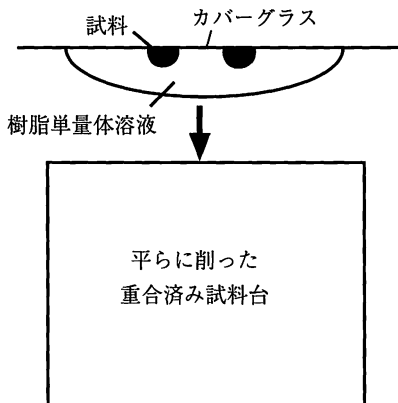


図2. カバーガラスにはりついた試料をそのまま重合させる方法

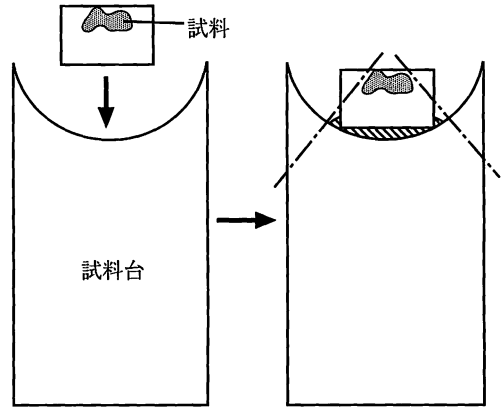


図3. 試料台への試料ブロックの取り付けとトリミング

脂くずが散乱しないようにビニル袋などの中で行う。また、削った樹脂くずは散らかしたままにせず直ちに掃除する。組織片の中ほどから切片を切り出したいときは、試料の中ほどでブロックを割ってしまい、包埋された試料を露出させた方がその後の面出しが楽になる。

試料台を試料ホルダー(あるいはトリミング台)に取り付けその上に切り出した試料ブロックを載せ、実体顕微鏡下で観察しながら、切片を切り出す方向を真上に向けて瞬間接着剤で固定する(図3)。試料の周りの試料台部分や、試料の周りの余計な部分の樹脂をニッパーやカミソリで削り取り、試料を頂点としたピラミッド状にしておく(図3)。

**面出し:**試料の目的の部分までガラスナイフで切り進める。試料を載せた試料台を試料ホルダーに固定し、そのホルダーをマイクロームに取り付ける。試料ホルダーの側面に90度ごとに引いてある4つの刻印のうちひとつの位置を、マイクローム試料ヘッドに鉛筆でマークしておく。ガラスナイフをナイフホルダーに取り付け、試料の面(垂直な面)とナイフの試料側の面とのなす角(「逃げ角」)を2-5°に調節する。一般に逃げ角が大きすぎるとナイフの刃の損傷が大きく、切片にしわが寄りやすくなり、小さいと切片の巻き込みなどのトラブルが起きやすくなる。双眼鏡で観察しながらナイフの前縁を試料表面少しずつ近づけて行く。極端な厚切りをしてしまうとナイフも試料も損傷してしまうので、ある程度近づけたら止めておく。刃をある程度近づけたところでマイクロームの試料送りを約1μmにセットし作動させる。しばらく回していると試料表面の一部が切れ始めるので、試料送りを0.5μm程度に減じて厚切り切片を切り進む。適当なところまで切り進んだら、次の方法で試料の深さを確かめ、削り出している試料面の直下に目的の組織や細胞が出てく

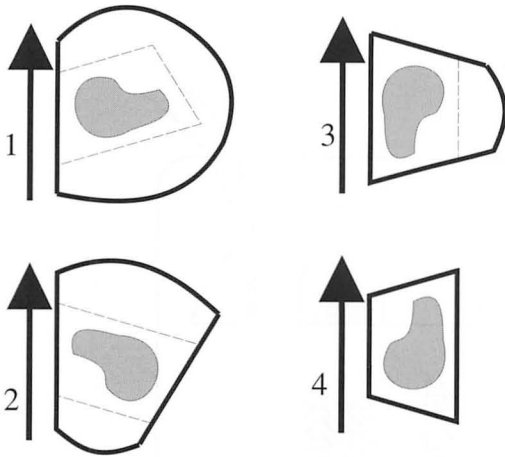


図4. 試料面をきれいな台形にトリミングする方法。詳しくは本文を参照のこと

るまで切り進んで行く。

**試料位置の確認：**試料ホルダーをヘッドからはずし、切るべき細胞が試料面に出ているかどうかを光学顕微鏡の透過光で調べる。まだ試料が試料面に出ないときはこのあと切り進むべき深さを、焦点が合うところの顕微鏡ステージの上下動から見当をつけておく。ナイフを充分下げてから、試料ホルダーをヘッドのマークに合わせて再度マイクロームに取り付けて面出しを続ける。また、ガラスナイフの刃の上に切り出された厚切り切片をまつげかピンセットで拾って、細胞の様子を光学顕微鏡で観察することもできる。(脚注3)

**再トリミング (連続切片のための)：**ガラスナイフのよく切れる側 (ここでは右側がよく切れるようにガラスナイフが作られているとする) を使って試料面をきれいな台形にトリミングする。まずガラスナイフを充分下げておいてからナイフの手前側を左方向へ5-10度ずらして固定する (ずらす前の元の位置を覚えておく)。最初に台形の左斜辺をトリミングする。試料ホルダーをマークから左回りに5-10度回して取り付けて、ガラスナイフを面出しの時のように慎重に近づけ、右側が台形の左斜辺に沿って進むように0.5  $\mu\text{m}$ 程度の厚切りで切り進む (図4の1)。切り進む厚さの合計は、目的とする試料の深さよりも充分に深くなるようにする。次にナイフを充分下げておいてから、試料ホルダーを180度回転させ、そこの刻印がマークの右回りに5-10度になるように取り付けて、左斜辺と同様に台形の右斜辺に沿って切り進む (図4の2)。両斜辺をトリミングしたら、試料ホルダーを左回りに90度回転させ、そこの刻印がマークに重なるように取り付けて、

台形の下底に沿って切り進む (図4の3)。最後に試料ホルダーを180度回転させ、そこの刻印がマークに重なるように取り付けて、台形の上底に沿って切り進む (図4の4) トリミングを終える。ナイフを下げ、試料ホルダーを最初の位置に戻し、トリミングの切り屑を柔らかい筆で拭き取り、手前を左にずらしたナイフを元の位置に戻す。

**薄切：**ダイヤモンドナイフで超薄切片を切り出す。ダイヤモンドナイフのポートに水を盛り上がる位溜めてしばらく静置しナイフを親水化した後、水を良く切り、再度水を溜めてから水面がナイフの刃よりも幾分低くなる程度注射器などで水量を調節する。このとき水際がナイフの刃先と離れてしまわないように、またポートの水が汚れないように注意する。面出しのときと同様に、ナイフの前縁を慎重に試料に近づけて行く (ナイフは横方向からの力に弱い)。面出しによる平滑な試料面にナイフの前縁の反射が映るので、その反射の消長によりナイフと試料面の間隔を監視する。ある程度近づけたらマイクロームの試料送りを0.1  $\mu\text{m}$ 以下にセットし作動させる。台形の試料の一部分から全体が切り出されるようになり、切片が縦に並んだりボン状の連続切片がポートの水面上に伸びて来る (図5)。このとき切片が示す干渉色はその厚さによって異なり、厚さ100 nmの場合はやや金色がかかった銀色になる (より厚いときは金色-青色、薄いときには銀色-灰色を示す)。

**載物：**切り出された切片のリボンをまつげで突いてナイフの刃から引き離し水面上に遊離させる。このとき切片は縦方向に幾分縮んでいるが、クロロフォルムを浸した紙や竹串の先端を切片の直上にかざすことにより伸ばすことができる。リボンが長いときは、リボンの途中で切片の間をまつげの先端で突くとリボンが分かれるので、グリッドに載せるためにちょうどよい長さにリボンの長さを分割する。まつげを使って、分割したリボンの1本あるいは数本をポートの中央に集め、縦向き横並びにしておく (図5)。

膜を張った単孔グリッドの横の金属部分を鷲型ピンセットでつまみ上げ、単孔の長軸方向が垂直になるように保持する。並べたりボンの向こう側に表 (マジック)

(脚注3) 拾った切片をスライドグラス上の水滴上に移し、スライドグラスをアルコールランプなどで軽く熱し水を飛ばすと、切片がスライドグラスに貼り付く。その上から1% トルイジンブルー水溶液 (あるいは1% borax 水溶液に溶かしたもの) を載せ (染色を強めたいときは軽く熱したあと)、流水で洗い風乾して観察する。

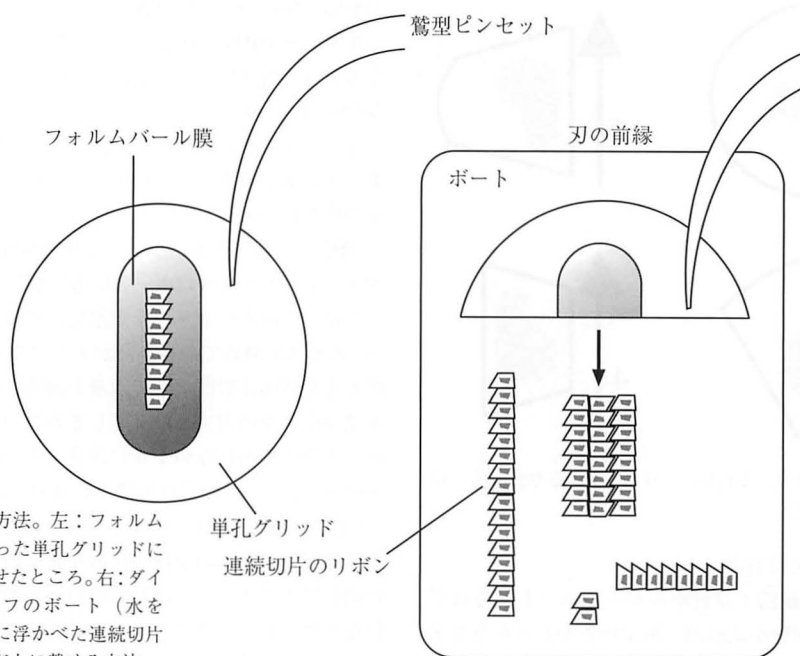


図5. 載物の方法。左：フォルムパール膜を張った単孔グリッドに連続切片を載せたところ。右：ダイヤモンドナイフのポート（水を張ってある）に浮かべた連続切片を単孔グリッド上に載せる方法。

クで印を付けた側)を手前に向けて、グリッドの単孔部分の大部分が漬かるまで入水させる。リボンの向きが乱れないように（もし乱れたらもう一方の手で持ったまっげで修正しながら）グリッドをゆっくり手前に動かし、リボンの前端が単孔の膜に触れたら、リボンを持ち上げるようにグリッドをゆっくり垂直に引き上げる。リボンが載ったグリッドを風が垂直に当たらないようにドライヤーで乾かし、照明の反射光や実体顕微鏡下で、膜上に載せたりボンが単孔の中に納まっていること、膜に損傷がないことを確認する。載物を終えたグリッドは、どのような試料を載せたのかが分かるように区別して、ホコリをかぶらないように、シャーレに敷いたろ紙の上やグリッドケースに保管しておく。

#### [電子染色]

グリッドに載せた試料切片を染色液(ウランと鉛)・洗浄液の水滴上に順次浮かべることにより染色を行う。清潔なシート(パラフィルム,あるいはよく洗ったデンタルワックス板など)を2枚用意し,1枚はシャーレの底に敷き詰めた水酸化ナトリウムの粒の上に置きシャーレの蓋をしておき,もう1枚は外に置き,ホコリが付かないようにシャーレの蓋などをかぶせておく。外のシートの上には,染色するグリッド1枚あたり酢酸ウラニル溶液(20-30  $\mu\text{L}$ ) $\times$ 1滴,水(50-100  $\mu\text{L}$ ) $\times$ 4滴を並べておく。

染色するグリッドの表を下にして酢酸ウラニル溶液滴上に浮かべて,10-30分間染色する。ウラン染色を終えたグリッドをつまみ上げ,グリッドの縁にろ紙片を当ててグリッド上に残ったウラン溶液を除き,1番目の水滴に浮かべて洗浄する。水酸化ナトリウム上に置いたシート上にグリッド1枚あたり1滴のクエン酸鉛溶液を置き,ウラン染色を終えたグリッドを浮かべ,シャーレの蓋をして5分間染色する。鉛イオンは炭酸イオンと反応し沈殿を生ずるので,シャーレの蓋を長時間開けて外気にさらしておいたり,実験者の吐息が鉛溶液・試料に直接かからないように注意する。鉛染色を終えたグリッドをつまみ上げ,余分の染色液をろ紙で吸い取り,2,3,4番目の水滴に順次浮かべた後,洗浄瓶からの流水でよく洗い(このときグリッドに直接流水が当たらないように注意;ピンセットを介してグリッドに水が通るようにする),水をろ紙で吸い取り,ドライヤーで乾燥させて所定の場所に保管しておく。染色を終えたグリッドは,膜・切片のドリフトを防ぐため薄く褐変するくらい炭素を蒸着させてから電子顕微鏡で観察する。

#### 謝辞

本稿の作成に当たって,本村泰三(北海道大・理・海藻研),奥田一雄(高知大・理・生物)の両博士から貴重な助言を頂いたことに感謝の意を表する。