

透過電子顕微鏡における動物細胞試料作製法での後固定は 高分子Gel着色に応用できるか

Applicatino of creature cell fixation method on TEM to polymer hydrogel coloring

工学部技術部分析技術班

中村 昇二

SHOJI NAKAMURA (Department of Technique)

Our laboratory has been studying polymer hydrogel as chemo-mechanical actuator-material and are developing new hydrogel material. The polymer hydrogel have the internal structure of μm -order network. In this case, sectional observation of TEM is very important to analyse for micro structure. The previous papers showed that the process of specimen for polymer hydrogel. Howe'er, there were one problem that the buried specimen in epon has not colored to distinguish between specimen and epon. In this paper, showed that the application of creature cell fixation method on TEM to polymer hydrogel coloring.

key Words; Polymer hydrogel, Chemomechanical, Creature cell fixation, TEM

1. 緒言

前回の技術報告では、透過電子顕微鏡・動物細胞試料作製法を高分子Gelの断面構造解析に応用した経過を報告した。しかし、その作製過程の体系化において一つの課題が残された。それは、エポキシ樹脂に包埋された試料をウルトラミクロトームで超薄切片作製をおこなうとき、エポキシ樹脂と白い半透明である高分子Gelとの見分けが難しく切片作製が困難というものであった。

そこで、今回は高分子Gelへ着色するために、同じく動物細胞試料作成過程での細胞固定・後固定に用いられる四酸化オスミウム (OsO_4) を応用してみた。

結果、包埋時のエポキシ樹脂と高分子Gelとの見分け可能な程の着色効果と共に、思わぬ副産物が生まれた。それは、電子顕微鏡観察時の試料への付色効果に欠かせない電子密度を高めるとい電子着色効果が発生し、前回よりもより鮮明な電子顕微鏡像が得られた。

2. 高分子Gel

母材はポリビニールアルコール (以下、PVAと略す) を用いる。エタノールを用い強靱化処理を施し、伸張率500%以上、最大引張強度40kg/km²という優れた力学特性をもち、かつ化学的にも安定な材料である。これら2種の高分子材料を混合、架橋させることによりより優れた高分子生体模倣材料を作製する。Fig.1に分子構造を示す。

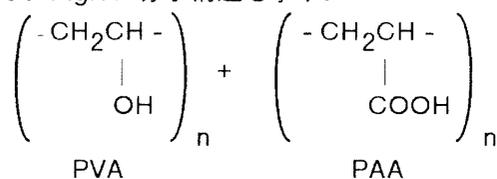


Fig.1 Structural formula of Gel material

3. 動物細胞試料作製法後固定

固定とは、細胞組織を電子顕微鏡 (以下、電顕と略す) で観察するための試料作製の一過程である。目的としては、①細胞内の組織の変化を最小限に抑え、できる限り元の状態を保持すること。②細胞内の様々な成分を不動化し、後の試料処理過程 (脱水・包埋) において流出しないように耐えるものにする。

そこで一般的に用いられるのが化学固定としての四酸化オスミウム (OsO_4) である。

四酸化オスミウム (分子量254.2) はオスミウム (原子量190.2、原子番号76) の酸化物である。生体膜の成分であるリン脂質をよく固定するという特徴をもち、蛋白質に対する固定効果は少なく、また蛋白質を破壊することもある。

危険性としては、著しい酸化作用をもち吸入すると毒性を示し、接触、蒸気共に皮膚、粘膜、角膜、結膜の破壊、特に接触は失明の恐れがあるほどの薬品である。

4. 高分子Gelへの着色

4. 1 高分子Gelへの後固定の応用

Fig.2にエポキシ樹脂に包埋された試料を示す。この包埋された試料をナイフ、グラインダー等を用いウルトラミクロトームでの超薄切片作製のためのトリミングを行う。前回の報告では、超薄切片の作製には成功したのであるが、試料とエポキシ樹脂との間に色的コントラストが少なくトリミングが困難であった。

そこで、今回の報告では試料とエポキシ樹脂とのコントラストを付加するために四酸化オスミウムを用いた。

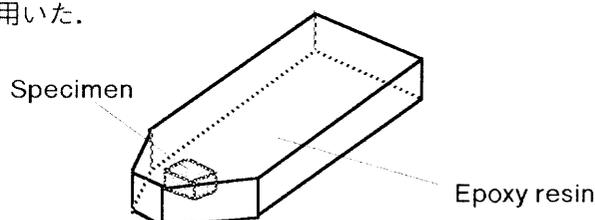


Fig.2 Schematic illustration of flat plate burying

4. 2 後固定四酸化オスミウムの使用条件

一般的に、動物細胞を固定するための条件として次の3つの条件を満たさなければいけなといわれている。ただし、今回の報告での高分子Gelへの応用においては未知の材料であるため、著者の経験のある哺乳動物・マウスで行った条件を基に固定過程を応用した。Table.1-3に浸透圧、pH、固定液濃度の一般的な各条件を示す。

条件① 浸透圧

固定液の浸透圧については、総浸透圧（緩衝液の浸透圧と固定剤の浸透圧）が基本であるのか、または、それぞれの浸透圧を考えなくてはならないのかは解っていない。ただ、四酸化オスミウムは組織への浸透性が緩慢であるので、緩衝液が先に細胞に到達して作用し、その後固定剤が細胞膜の半透性を奪う。そのため、緩衝液の浸透圧を哺乳動物細胞の浸透圧である300mOsm近くを用いる。

Table.1 Osmotic pressure of body liquid for mammal

Mammal	300mOsm
Frog	260mOsm
Earthworm	184mOsm

Table.2 Osmotic pressure of buffer

0.05M Phosphate buffer	110mOsm
0.10M Phosphate buffer	215mOsm
0.20M Phosphate buffer	410mOsm

Table.3 Osmotic pressure of fixation medicines

0.5% OsO ₄	10mOsm
1% OsO ₄	36mOsm
2% OsO ₄	72mOsO ₄

条件② pH

動物細胞内のpHは中性ないし塩基性であり平均pH7.4位である。そのため、固定に用いられる固定液のpHはpH7.2~7.4が一般的に使われている。

条件③ 固定液の濃度

固定液の濃度は、固定液の組織への浸透性と関係する。高い濃度の固定液の方が、浸透速度は速く、固定液の濃度が低いと浸透性が悪く、固定時間を長くしなければ微細構造が保持できない。

5. 高分子Gel試料作製法

4.2の条件を考慮しながら動物細胞試料作製法での後固定を高分子Gel着色に応用した。作製手順は、前回の報告での作製方法の「試料摘出」過程と「脱水」過程の間に1%四酸化オスミウム/bufferによる浸漬過程を加えた。Fig.3に前回体系化した試料作製法に動物細胞試料作製法・後固定を加えた高分子Gel試料作製法を示す。

6. 結 言

Fig.4に動物細胞試料作製法・後固定過程を用いて高分子Gelに着色した写真を示す。

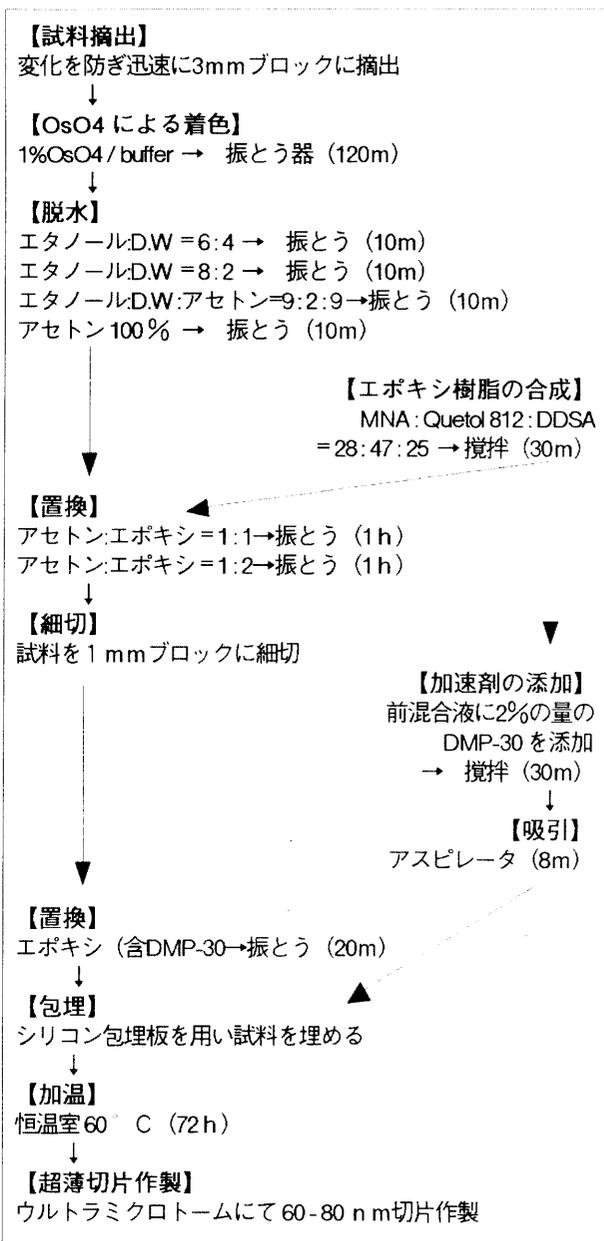


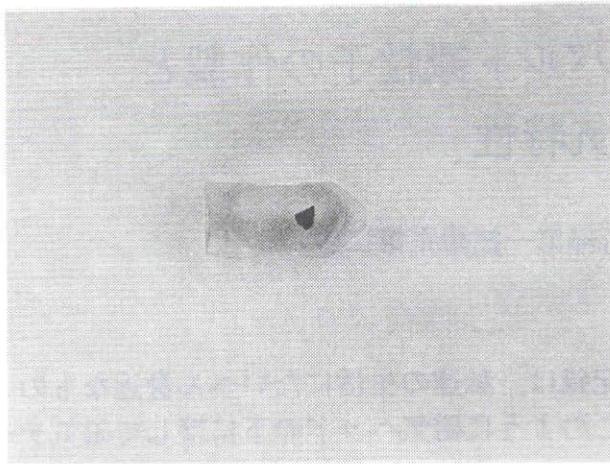
Fig.3 Preparation of polymer hydrogel on TEM

写真から解るように、以前はエポキシ樹脂に包埋された高分子Gelのコントラストが殆ど無いものであった。しかし、今回の四酸化オスミウムでの浸漬を行うことにより高分子Gelが黒く着色した。これは、四酸化オスミウムの著しく強い酸化作用によるものと思われる。これにより超薄切片作製過程であるウルトラマイクロトーム加工の前処理でのトリミングが容易に行えるようになった。

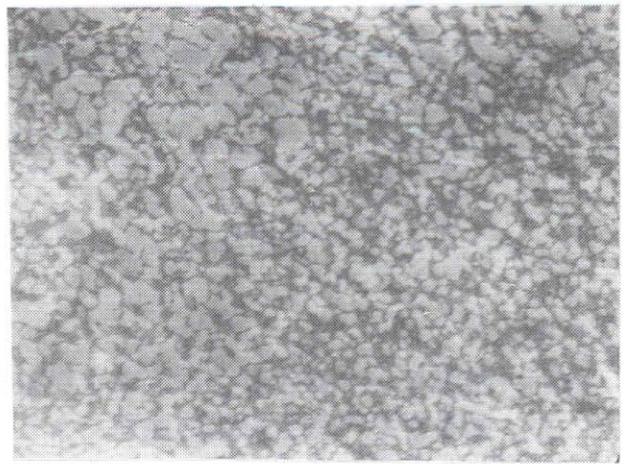
以上から、当初の目的である高分子Gelの着色は達成された。

また、本試料の透過電顕写真をFig.5に示す。ここで、四酸化オスミウムへ浸漬したものとしていないものを観てみると、明らかに前者の方が高分子材料の混合架橋された部位が濃くなっているのが解る。これは、四酸化オスミウムを添加することによる電子密度の上昇という思わぬ相乗効果が生まれたことによるものと考察する。

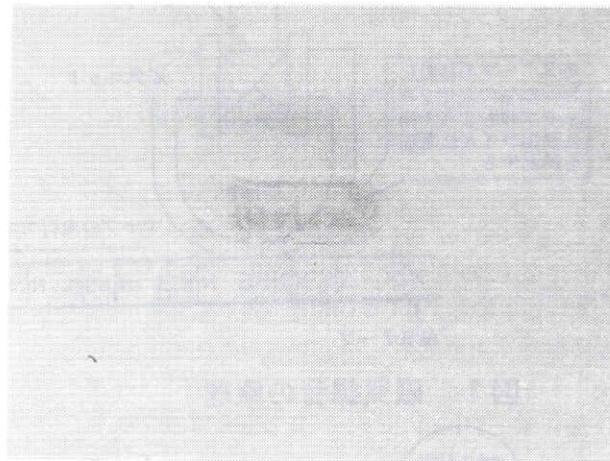
まとめとして、今回のアイデアは著者の動物細胞の電顕試料作製の経験上での、マウス細胞の固定で



(a) Soak in osmium tetroxide

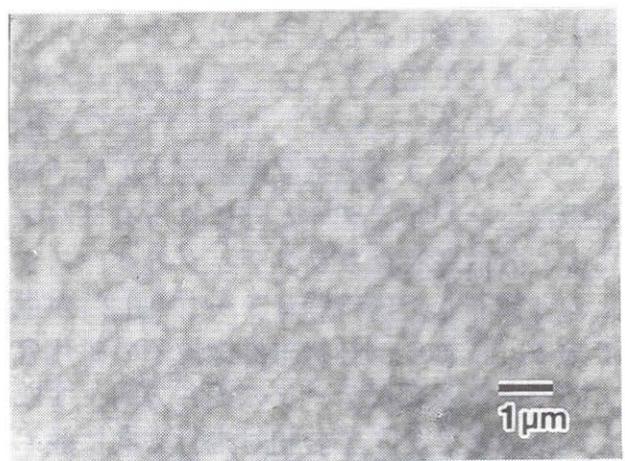


(a) Soak in osmium tetroxide



(b) Not soak in osmium tetroxide

Fig.4 Appearance of flat plate bryonig



(b) Not soak in osmium tetroxide

Fig.5 TEM images of polymer hydrogel

の黒く変化するところから生まれたものであり、後固定の各条件は動物細胞での条件をそのまま応用した。

今後は、これらの各条件を試料のダメージを考慮したうえで、迅速的、経済的かつ安全性のある最適条件を探究してゆきたい。また、経済面・安全面を考えると、四酸化オスミウムに限っては2ml約5000円という高値なものであり、使用中の危険性、またその廃液の処理等を考え合わせると、この薬品に代わるもの考えることは特に重要であると思われる。

最後に、本報告が透過電顕試料作製技術において何らかのお役に立てれば大変幸いである。

・中村 昇二「技術報告集第4号」三重大学工学部技術部 (1996) pp.11-15

参考文献

- ・今井 貴寛「高分子材料による人工筋の特性評価」(1993)
- ・L.E.NIELSEN 著、小野木 重治訳 「高分子の力学的性質」化学同人(1965)
- ・医学生物学電子顕微鏡技術研究会編集「よくわかる電子顕微鏡技術」朝倉書店 (1993)