

包埋カプセル補助ツールを用いたピンポイント電顕試料作製法

Targeting Ultrastructural Observation of Biological Samples
by Using Capsule-Supporting Ring

高橋 伸育, 豊嶋 典世, 澤口 朗

Nobuyasu Takahashi, Fumiyo Toyoshima and Akira Sawaguchi

宮崎大学医学部解剖学講座 超微形態科学分野

要旨 スライドガラス上に貼付した準超薄切片やカバーガラス上に培養された培養細胞を電子顕微鏡で観察する場合、これらの観察試料を樹脂に包埋して超薄切する必要がある。従来法の1つに、樹脂を充填した包埋カプセルを試料の上から被せて包埋する方法があるが、包埋カプセルとガラス面が接着していないため、樹脂の漏出や重合過程でカプセルが横滑りする問題があった。特に免疫電顕用の低粘性樹脂は軽微な振動でも漏出しやすく応用が困難を極めた。

これらの問題を解決するため、包埋カプセルとガラス面を接着させる「包埋カプセル補助ツール」を独自に作製し、簡便かつ確実な電顕試料作製法を開発した。本法により、一般的なエポキシ樹脂のみならず低粘性メタクリル樹脂の包埋において目的部位をピンポイントで透過電顕観察することが容易になり、医学生物学研究における電子顕微鏡の応用が広がるものと期待される。

キーワード：包埋補助ツール、樹脂包埋、電子顕微鏡、試料作製

1. はじめに

電子顕微鏡観察において「木を見て森を見ず」という落とし穴には常に注意が必要であるが、『森の中から稀少な木を選び、その葉を見る』ことが容易になれば、医学生物学領域の研究における電子顕微鏡の威力は倍加する(図1)。その1つの手段として、スライドガラス上に貼付した準超薄切片を光学顕微鏡レベルでスクリーニングし、目的の細胞や組織を含むように選び抜いた切片の上から樹脂を充填した包埋カプセルを被せて再包埋し、超薄切片を作製する方法がある¹⁾。しかし、包埋カプセルとガラス面が接着していないため、樹脂の漏出や重合過程でカプセルが横滑りすることが問題であった。特に免疫電顕用の低粘性樹脂²⁾は軽微な振動でも漏出するため応用は極めて困難であった。

これらの問題を解決するために、包埋カプセルとガラス面を接着させる「包埋カプセル補助ツール」を独自に作製し、一般的なエポキシ樹脂のみならず低粘性のメタクリル樹脂の漏出や重合中のカプセルの横滑りを防ぐ新たな包埋法を開発した³⁾。本稿では超微形態研究において、簡便かつ確実に『森の中から稀少な木を選び、その葉を見る』ための「包埋カプセル補助ツール」の使用法ならびに実例を紹介する。

2. 包埋カプセル補助ツール

本稿で紹介する「包埋カプセル補助ツール」はクッション

〒889-1692 宮崎県宮崎市清武町大字木原5200
TEL: 0985-85-1784; FAX: 0985-85-8406
E-mail: sawa@fc.miyazaki-u.ac.jp
2013年5月7日受付

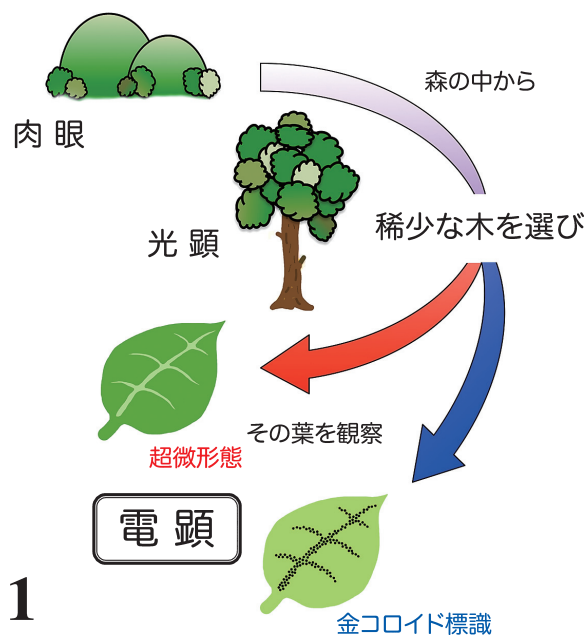


図1 包埋カプセル補助ツールを用いることで容易になる試料の選抜と超微形態観察のイメージ。

性に優れるEVA樹脂(エチレン酢酸ビニル樹脂)を素材としたリング状のツールで、片面にはスライドガラスやカバーガラスに接着させるための接着テープが貼られている。この原材料はホームセンターなどで家具のクッション材として販売されているもので、接着テープはクッション材を家具に接着させる目的で既に貼付されている。作製工程は卓上ボール盤(図2A)に装着した内径8mmの中空ドリルを用いて、

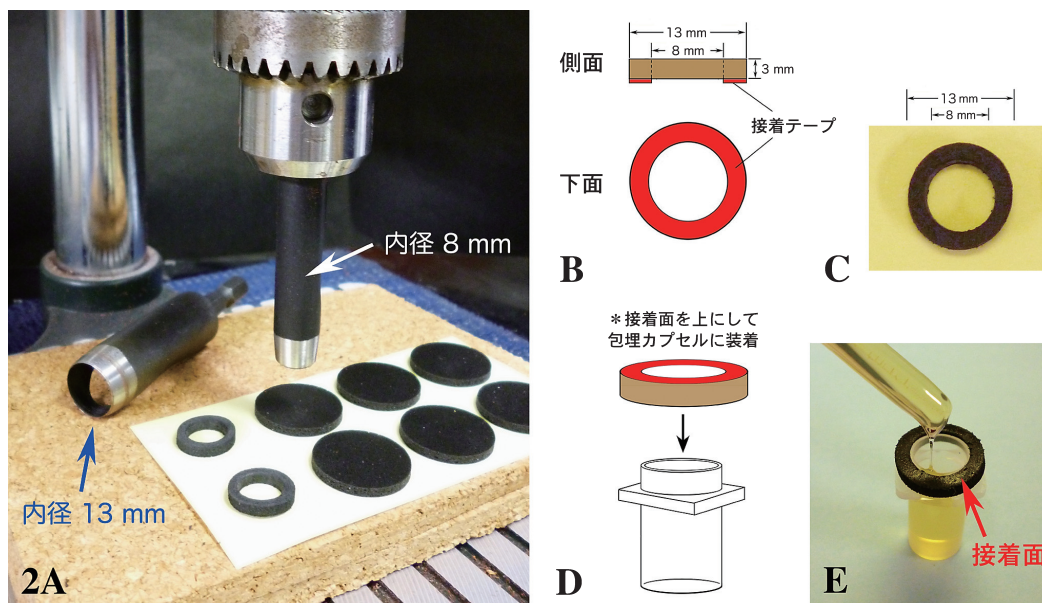


図2 (A) ボール盤を用いた包埋カプセル補助ツールの作製。(B) 包埋カプセル補助ツールの概要と (C) 実物写真、(D) 樹脂包埋カプセルへの装着方法と (E) 樹脂の充填方法。

樹脂包埋で汎用される包埋カプセル（外径8mm）にフィットする孔（図2B, C）を開け、次に内径13mmの中空ドリルで円盤状に切り出す簡単なものである。卓上ボール盤及び中空ドリルともに、ホームセンターなどで販売されている安価な製品で十分に作製できる。

使用に際しては、予め接着面を上にして包埋カプセルに装着した後（図2D）、カプセル内に樹脂を充填する（図2E）。なお、複数に及ぶ種類の試料を同時に包埋する場合、油性ペンで包埋カプセルに種別を記しておくといよい。

3. 包埋カプセル補助ツールを用いた試料ブロック作製法

光学顕微鏡下でスクリーニングされ、電子顕微鏡観察に用いられる準超薄切片を再包埋する場合、スライドガラスに貼付された準超薄切片を下にし、包埋カプセルの中心に準超薄切片が位置するように上から見定めながら、包埋カプセル補助ツールの接着テープに圧着させる（図3A）。続いて、上下を反転すると樹脂が準超薄切片の周囲を満たす（図3C, D）。この時、包埋カプセルにフィットした包埋補助ツールが接着テープでスライドガラスと密着しているため、樹脂の漏出やカプセルの移動が防止され、準超薄切片は重合された樹脂ブロックの中心で狙い通りに包埋される。

カバーガラス上に培養された接着性細胞を包埋する場合、固定から脱水まで完了した状態でカバーガラスの細胞接着面を下にし、包埋補助ツールの接着テープに圧着させる（図3B）。続いて、準超薄切片と同様に上下を反転すると、樹脂が細胞周囲を満たしながら浸透する。脱水にはエタノールを使用し、接着テープの粘着性を損なわないよう、余分なエタノールを揮発させて速やかにカバーガラスを接着テープ

に圧着させる。その後、細胞が乾燥しないよう直ちに上下を反転させる。

以上のプロセスは超微形態観察用のエポキシ樹脂ならびに金コロイド標識用の親水性メタクリル樹脂のいずれにも共通するもので、引き続き熱重合または紫外線重合を施していく。低粘性のメタクリル樹脂では浸透不良の心配は要らないが、粘性の高いエポキシ樹脂の場合は樹脂の浸透をはかるため、室温で1時間置いてから熱重合を開始している。

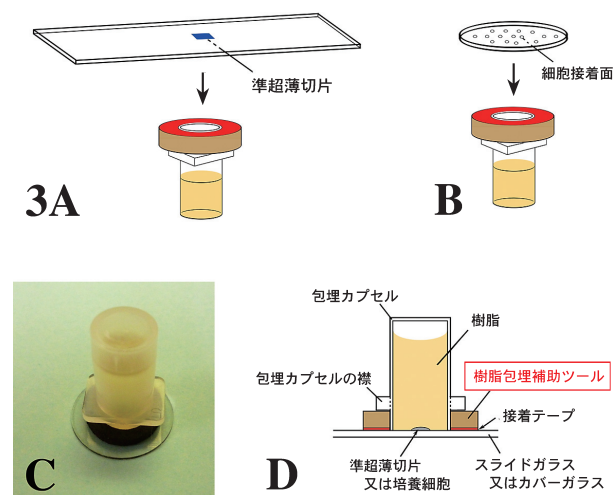


図3 (A) スライドガラスに貼付された準超薄切片を再包埋する方法。(B) カバーガラスに培養された接着性細胞を包埋する方法。(C) 重合時の状態を示す実物写真（カバーガラス使用例）と (D) 断面模式図。

4. 硬化した樹脂ブロックの取り外し方

重合により硬化した樹脂ブロックをガラス面から取り外すには「加熱法」と「急冷法」がある。加熱法は約 100°C に熱したホットプレート上に、スライドガラスを約 1 分間載せてから包埋カプセルごと樹脂ブロックを取り外す手法である。培養細胞を観察するカバーガラスの場合、この過程で割れてしまう恐れがあるため、厚さ 0.45 ~ 0.60 mm のカバーガラスを特注し、重合した後に瞬間接着剤でスライドガラスに固定してから加熱してブロックを取り外す。

冷却法は、液体窒素ガス中でスライドガラスを急冷する方法で、10 ~ 20 秒ほどで生じる「パチッ」というクラック音を合図に包埋カプセルごと樹脂ブロックを取り外す手法である。金コロイド標識を目的とするメタクリル系親水性樹脂の場合には、抗原性を保持する観点から冷却法による取り外しが推奨される。

5. 実例 1：準超薄切片の再包埋によるピンポイント超微形態観察

スライドガラスから取り外した樹脂ブロックを包埋カプセルから外して光学顕微鏡下に据えると、再包埋された準超薄切片を透視することができる。トルイジンブルー染色した準超薄切片は、実体顕微鏡もしくはマイクロームの拡大鏡でも十分に識別できるため、必要に応じてトリミングを施した後、超薄切片を作製する。

図 4 はラット単離胃粘膜モデルの胃小窩で起こる壁細胞の剥離現象⁴⁾を、本法を用いて超微形態観察した実例である。特定の胃小窩で見出される「剥離直後の壁細胞」を確実に電子顕微鏡下で捉えるため、トルイジンブルー染色した多数の準超薄切片をスクリーニングし (図 4 挿入写真)、剥離した細胞を含む準超薄切片から超薄切片を作製した。本法では、鏡面状の準超薄切片が樹脂ブロックの薄切面の中央に位置合わせされているので、ダイヤモンドナイフとの面合わせが容易であり、僅か 2 ~ 3 μm 厚の準超薄切片から、20 ~ 30 枚の超薄切片を確実に得ることができる。

6. 実例 2：準超薄切片の再包埋によるピンポイント分子局在解析

図 5 は高圧凍結後、Lowicryl K4M に包埋したラット胃粘膜試料を用いて、粘液ゲル層における胃底腺副細胞型粘液の局在をレクチン金コロイド法で解析した実例である。トルイジンブルー染色した準超薄切片を光学顕微鏡下でスクリーニングし、粘液ゲル層の保存状態が良い切片 (図 5 挿入写真) を Lowicryl K4M に再包埋して超薄切片を作製した。副細胞型粘液に含まれる糖鎖と特異的に結合する *Griffonia Simplicifolia Agglutinin* (GSA)-II レクチンを用いて金コロイド標識を施した結果、漿液成分の存在によって高電子密度を呈する副細胞型粘液の局在を、電子顕微鏡レベルで狙い通りに捉えることができた^{5,6)}。この方法は抗体を使用する免疫金コロイド法にも応用可能である。金コロイド標識には多くの手順と

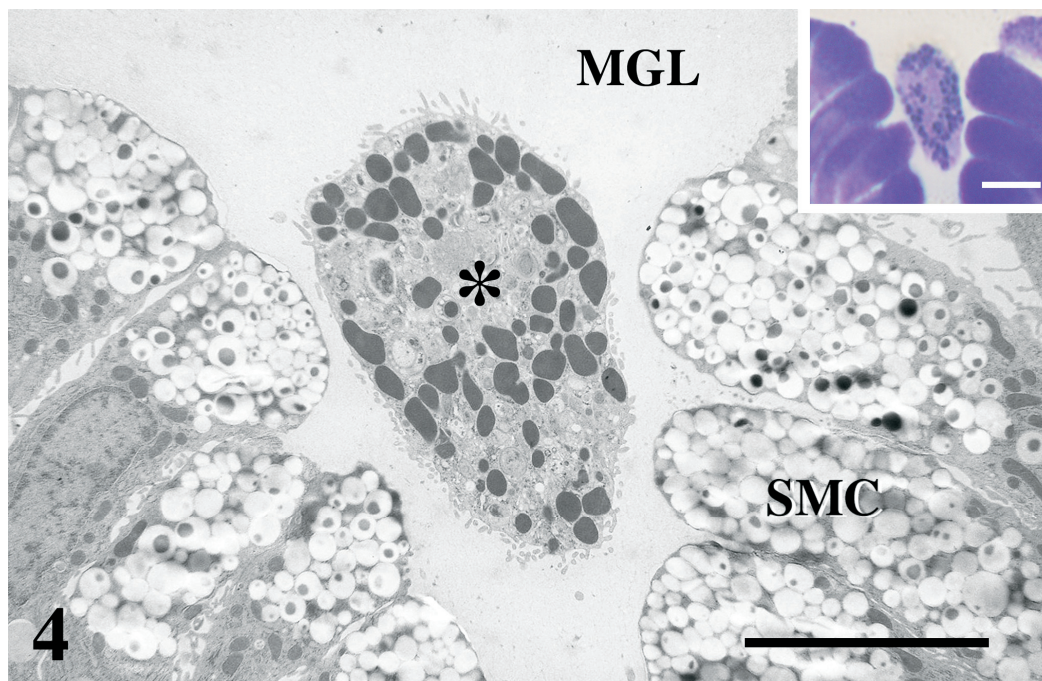


図 4 包埋カプセル補助ツールでエポキシ樹脂に包埋したラット単離胃粘膜の準超薄切片 (挿入写真: トルイジンブルー染色) と、それを再包埋後に薄切して観察した超微形態像。胃小窩において壁細胞 (*) の剥離現象を明瞭にとらえている。MGL: 粘液ゲル層, SMC: 表層粘液細胞。Bar: 5 μm。

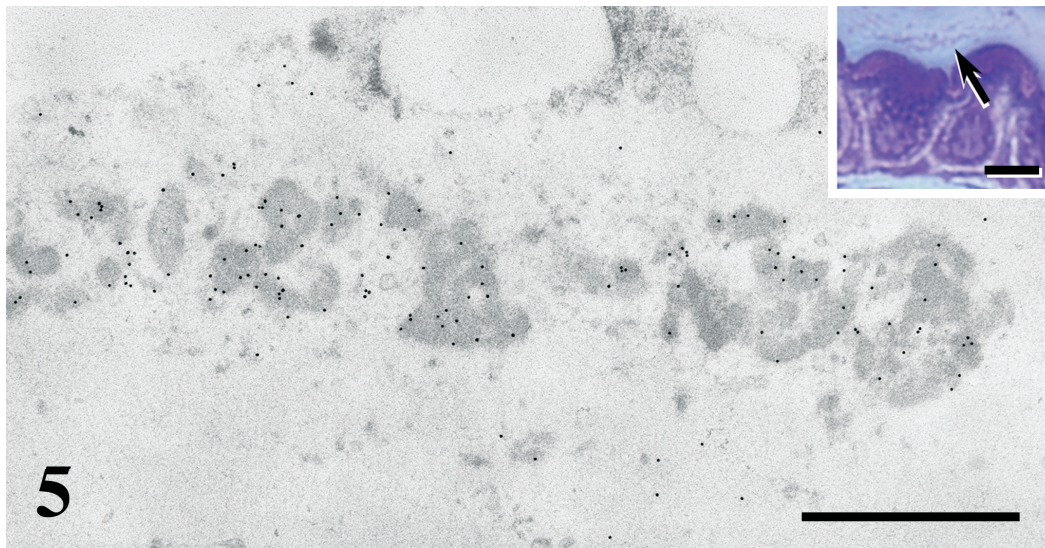
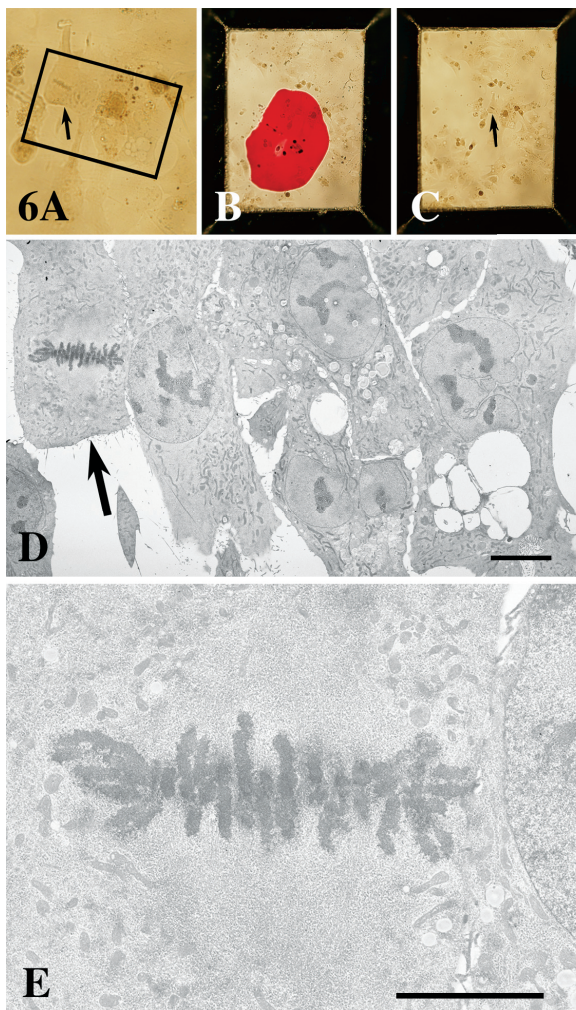


図5 包埋カプセル補助ツールでLowicryl K4M樹脂に包埋したラット胃粘膜の準超薄切片（挿入写真：トルイジンブルー染色）と、それを再包埋後に薄切してレクチン金コロイド標識を行った電顕像。胃粘膜粘液ゲル層において、副細胞型粘液と特異的に結合するGSA-IIレクチンの金コロイド標識が、高電子密度の漿液成分（挿入写真の矢印付近）に局在している。Bar:0.5 μm（電顕像）、5 μm（挿入写真）。



時間を要することから、予め狙いを定めて超薄切片を作製する本法は、稀な生命現象における糖鎖やタンパク質の局在解析に威力を発揮する⁷⁾。

7. 事例3：接着性培養細胞のピンポイント超微形態観察

カバーガラスから取り外した樹脂ブロックを包埋カプセルから外して光学顕微鏡下に据えると、包埋された培養細胞を透見できる（図6A）。この事例ではHepG2細胞の分裂像（図6A矢印）に狙いを定め、対物レンズと試料表面の間に油性ペンを挿入してマークし、その周囲を慎重にトリミングした（図6B）。100%エタノールでマークを除去した後（図6C）、超薄切片を作製して観察した結果、狙い通りに細胞分裂像を電子顕微鏡下で捉えることが出来た（図6D、E）。1つの樹脂ブロックから1つのトリミング区画に入りきらない複数の領域を観察したい場合は、油性ペンでマークした各部分を歯科用ドリル等で切り出し、別に用意した試料を含まない樹脂ブロック表面に瞬間接着剤で再マウントした後、超薄切片を作製している。

また、細胞接着面に対する垂直断で細胞形態を捉える必要がある場合、まず包埋カプセル補助ツールで作製した樹脂ブロックを歯科用ドリルで切り出し、横向きに再マウントして準超薄切片を作製する（図7挿入写真）。これを包埋カプセル

図6 包埋カプセル補助ツールを用いて包埋したカバーガラス接着培養細胞の超微形態観察像。矢印は観察対象の細胞分裂像を示す。(A) 樹脂ブロック表面像。(B) 油性ペン（赤）でマークした観察対象領域を残してトリミングされた樹脂ブロック表面像。(C) マークを除去した後の樹脂ブロック表面像。(D) 図(A)の枠内に相当する電子顕微鏡弱拡大像。(E) 細胞分裂の強拡大像。Bar:10 μm (D)、5 μm (E)。

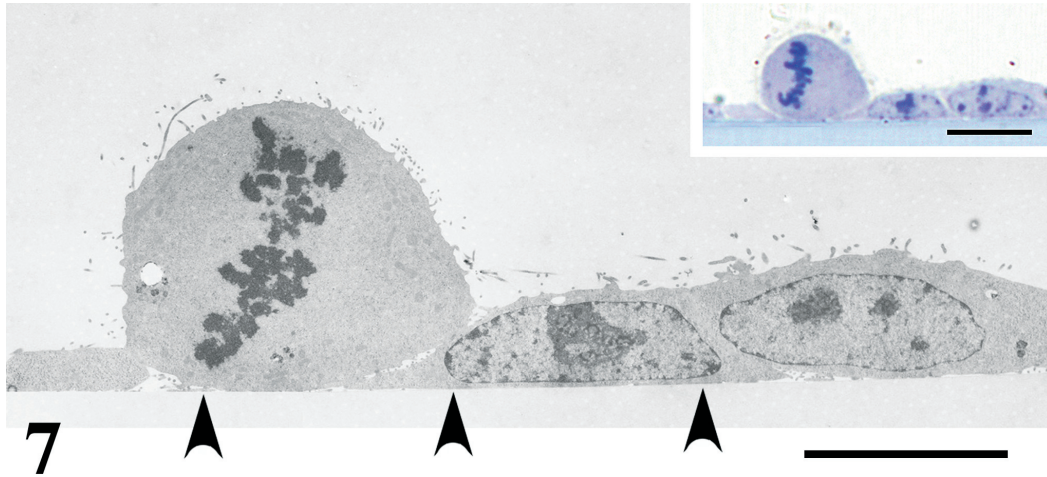


図7 包埋カプセル補助ツールを用いて包埋したカバーガラス接着培養細胞の垂直断面像。垂直断面方向で作製した準超薄切片にトルイジンブルー染色を施し、稀にしか観察できない細胞分裂像を含む準超薄切片(図7挿入写真)を選抜。再度、本法により樹脂に包埋して超薄切片を作製して観察を行った。矢頭:カバーガラス接着面。Bar: 5 μ m。

ル補助ツールでもう一度、再包埋して超薄切片を作製する「合わせ技」が効力を発する(図7)。

8. 実例4: 接着性培養細胞の分子局在解析

包埋カプセル補助ツールを使用することにより、レクチン金コロイド法や免疫金コロイド法を目的として、カバーガラスに接着した培養細胞を低粘性の親水性メタクリル樹脂に包埋することが可能になった。図8は *Ricinus Communis agglutinin* (RCA)-I レクチンを用いて金コロイド標識された HeLa 細胞内のエンドソームを示す。

9. おわりに

電子顕微鏡レベルでの観察対象に狙いを定めた試料作製を可能にする包埋補助ツールと、その実践的な使用方法について紹介した。本稿で示した通り、準超薄切片の光学顕微鏡像と

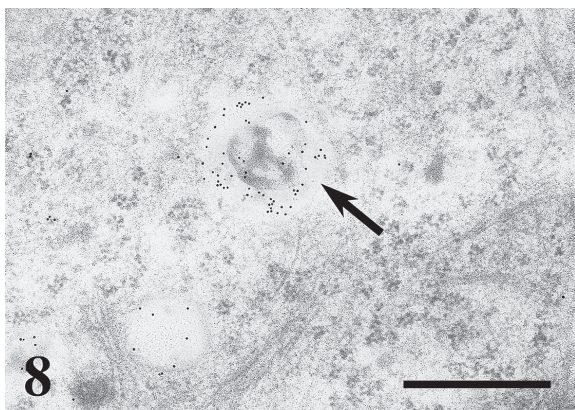


図8 包埋カプセル補助ツールを用いて包埋した接着性培養細胞のレクチン金コロイド標識電顕像。樹脂は Lowicryl K4M を使用。RCA-I レクチンを用いた金コロイド標識が、HeLa 細胞のエンドソーム(矢印)に局在している。Bar: 0.5 μ m。

超薄切片の電子顕微鏡像を併せることで、観察像の説得力が格段上がる。

特に iPS 細胞の開発を契機として、近年の医学生物学研究における培養細胞の超微形態観察は重要度を増しており、特定の細胞にピンポイントで狙いを定めることができる本法は、大きな推進力となる⁸⁾。さらに本法は包埋前免疫反応法(pre-embedding immuno-electron microscopy)において免疫反応後の切片を樹脂に包埋する際や、トモグラフィ解析といった様々な超微形態解析に応用可能であり、『森の中から稀少な木を選び、その葉を見る』という電顕観察の新たな潮流によって、1つでも多くの研究課題が解決されることを期待してやまない。

文 献

- 1) Bozzola, J.J. and Russell, L.D. (Eds.), Electron microscopy: principles and techniques for biologists, 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers, Boston. 17-47 (1999)
- 2) Carlemalm, E., Villiger, W., Hobot, J.A., Acetarin, J.D. and Kellenberger, E.: *J. Microsc.*, 140, 55-63 (1985)
- 3) Sawaguchi, A., Aoyama, F., Ide, S. and Suganuma, T.: *J. Microsc.*, 234, 113-117 (2009)
- 4) Aoyama, F., Sawaguchi, A., Ide, S., Kitamura, K. and Suganuma, T.: *Histochem. Cell Biol.*, 129, 785-793 (2008)
- 5) Sawaguchi, A., Ishihara, K., Kawano, J., Oinuma, T., Hotta, K. and Suganuma, T.: *J. Histochem. Cytochem.*, 50, 223-234 (2002)
- 6) Sawaguchi, A., Ide, S., Kawano, J., Nagaïke, R., Oinuma, T., Tojo, H., Okamoto, M. and Suganuma, T.: *Arch. Histol. Cytol.*, 62, 447-458 (1999)
- 7) Nishi, M., Aoyama, F., Kisa, F., Zhu, H., Sun, M., Lin, P., Ohta, H., Van, B., Yamamoto, S., Kakizawa, S., Sakai, H., Ma, J., Sawaguchi, A. and Takeshima, H.: *J. Biol. Chem.*, 287, 33523-33532 (2012)
- 8) Takayama, N., Nishimura, S., Nakamura, S., Shimizu, T., Ohnishi, R., Endo, H., Yamaguchi, T., Otsu, M., Nishimura, K., Nakanishi, M., Sawaguchi, A., Nagai, R., Takahashi, K., Yamanaka, S., Nakauchi, H. and Eto, K.: *J. Exp. Med.*, 207, 2817-2830 (2010)