

## 電子顕微鏡室の業務紹介

地家豊治<sup>1)</sup>, 井上広一<sup>2)</sup>, 羽尾裕之<sup>3)</sup>, 石井敬基<sup>3)</sup>

### Information about electron microscope laboratory

Toyoharu JIKE<sup>1)</sup>, Koichi INOUE<sup>2)</sup>, Hiroyuki HAO<sup>3)</sup>, Yukimoto ISHII<sup>3)</sup>

#### 1. はじめに

##### 電子顕微鏡室の研究支援業務紹介

医学研究支援部門 形態系 電子顕微鏡室では臨床検査技師および電子顕微鏡技術認定試験一級技士資格保有の担当者が主に電子顕微鏡を用いた超微形態観察に対応した研究支援を行っている。具体的には、観察目的にあわせた固定液や薬液の調整、試料標本作製、電子顕微鏡の調整、観察補助および撮影をサポートし、目的観察像が得られるまでの研究支援を行う。加えて光学顕微鏡観察のための標本作製、標準染色・特殊染色・免疫染色も可能であり、電子顕微鏡室内で光学顕微鏡観察から電子顕微鏡観察までの観察倍率をシームレスに形態観察研究を行うことができる。

#### 2. 透過電子顕微鏡観察

\* 設置機器 JEOL-1200 EX II 日本電子

- 分解能 0.2 nm (HC) 0.14 nm (HR)
- 観察倍率 ×800 ~ 600, 000
- 加速電圧 40 ~ 120kV \* 通常の組織観察時は 80kVにて使用

透過型電子顕微鏡観察については医学・生物学で行われる主な観察方法として病理光学顕微鏡標本と同様に観察目的にあわせた均等な厚みを持った組織切片を作製し、酢酸ウランと鉛による電子染色を施した標本を透過電子顕微鏡真空鏡体内にいれ標本を透過する電子から得られる陰影を観察する。

一般的に行われている光学顕微鏡観察のための標本切片厚は通常 4μm 前後であるが、透過電子顕微鏡観察のために必要な切片厚は 60 ~ 80nm である。光学顕微鏡用のパラフィン包埋と異なり透過電子顕微鏡用試料はより硬度のあるエポキシ樹脂に包埋することでこの電子線が透過できる超薄切片厚が得られるため観察対象の切片厚による組織像の重なりによる画像干渉が減少するために組織・細胞小器官が高倍率での観察が可能となる。

標本作製の作業工程はキット化・機械化がなされていないため観察対象の組織性状や観察目的にあわせて固定液・固定時間検討し、脱水・樹脂浸透を行う必要があり、超薄切標本作製の段階から文献と知識・経験から得られた技術を駆使し総てを手作業で行う必要がある。

観察像を得る仕組みとしても電子顕微鏡は電子を磁力により屈折をさせることで倍率を得る。したがって観察目的にあわせて電子線の加速電圧の選択や電子線の軸調整・批点補正の調整が観察の都度必要となる。電子顕微鏡室ではこれらの工程を担当技術員がすべてサポートしている。

研究支援として経験のある観察対象組織は人体病理組織、海洋生物や淡水魚・両生類を含む動物組織のみならず培養細胞の標本作製観察をおこなっており試料作製・観察経験は多岐にわたる。また、ウィルスや細菌・超微構造物、無機物の構造観察のためにネガティブ染色法やイオン液体を用いた金属錯

1) 日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門 電子顕微鏡室  
2) 日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門 中央写真室  
3) 日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門  
地家豊治: jike.toyoharu@nihon-u.ac.jp

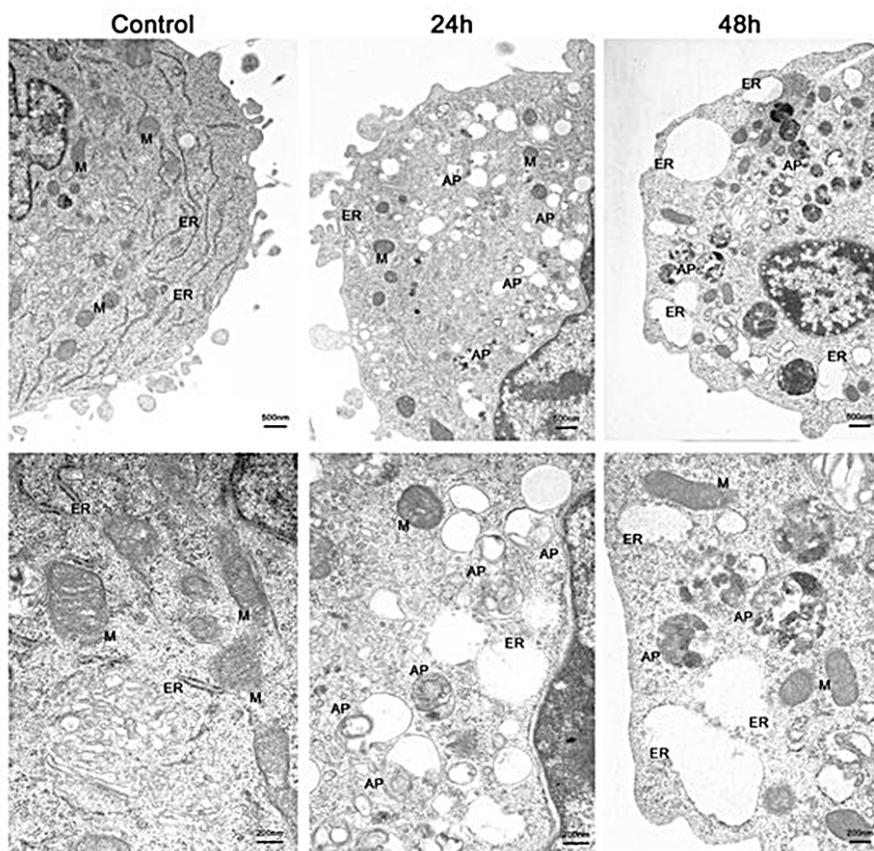


図 1 XBP1-FoxO1 interaction regulates ER stress-induced autophagy in auditory cells より引用

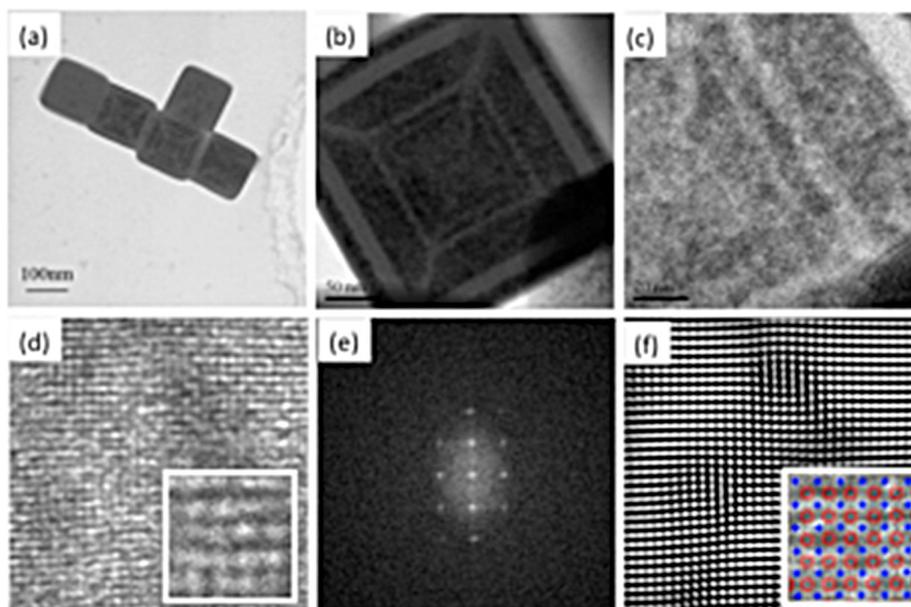


図 2 Direct Observation of Short-Range Structural Coherence During a Charge Transfer Induced Spin Transition in a CoFe Prussian Blue Analogue by Transmission Electron Microscopy より引用

体の構造観察など電子顕微鏡の調整や試料作製を工夫しながら現状の機器で可能な研究支援を行っている。

### 3. 走査電子顕微鏡観察

- \* 設置機器 S-4000形 日立走査電子顕微鏡
- 二次電子像分解能 1.5nm
- 観察倍率  $\times 20 \sim \times 300,000$
- 加速電圧 0.5 ~ 30kV \* 通常の組織観察時は 3kVにて使用

走査型電子顕微鏡観察にて得られる画像は虫メガネや実態顕微鏡の観察像のように標本の表面観察像を得るための顕微鏡である。通常の観察法では電子線の反射・放出を得るために観察試料に金属蒸着を施し観察を行うので虫メガネや実態顕微鏡のように組織透過光から内部構造の観察を行うことはできない。したがって観察目的部位を露出させるため組織の切断や切断後にオスミウム酸を用いた浸軟処理など観察目的にあわせた様々な処理を行うことで目的部位を露出させ観察を行う。

透過電子顕微鏡の観察利用とは異なり病理学的な貢献度は低くなる。しかし、培養細胞の形態、細胞同士の隣接・接着状態、摘出標本の構造観察、細菌の付着状態などに多く用いられる。

観察標本を傾斜・回転による観察が可能であり、走査電子顕微鏡の観察環境、ワーキングディスタン



図4 花粉の世界をのぞいてみたら  
— 驚きのミクロの構造と生体の不思議 —  
走査電子顕微鏡観察で得られた画像をわかりやすく着色し出版. 編集委員・執筆者として参加

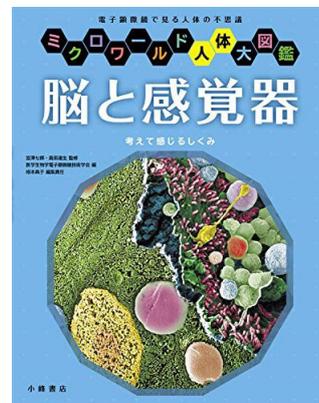
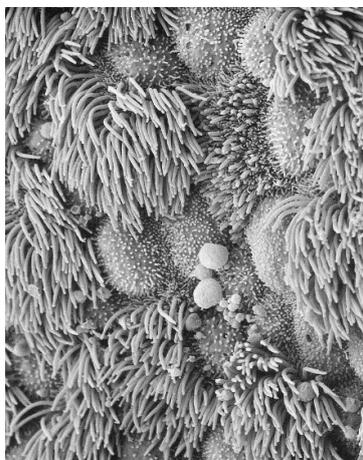
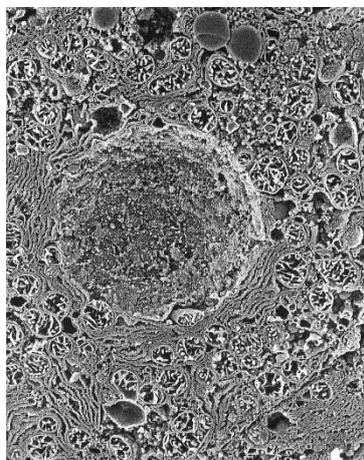


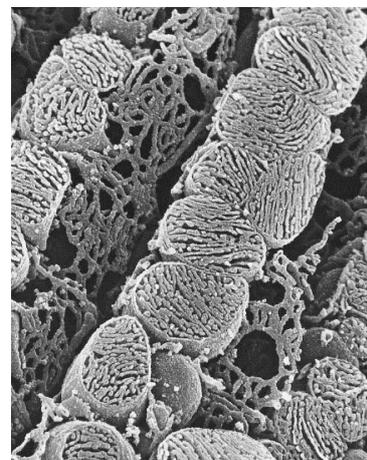
図5 ミクロワールド人体大図鑑  
脳と感覚器 考えて感じるしくみ  
走査電子顕微鏡観察で得られた画像をわかりやすく着色し出版. 編集委員・写真撮影・提供・画像処理として参加



気管上皮細胞  
通常観察



浸軟法により露出させ観察を行った  
細胞小器官の観察



浸軟法により露出させ観察を行った  
心筋細胞内のミトコンドリア

図3 走査電子顕微鏡を用いた様々な観察像 ミクロの不思議な世界 より引用

ス・加速電圧の設定を変更することで被写界深度の深い立体的な観察像を得ることができる。

透過電子顕微鏡を用いて高分解能な断面構造を確認し、走査電子顕微鏡で立体的な全体の構造を確認することで、より正確な形態の知見を得ることが可能となる。

#### 4. 光学顕微鏡標本作製

\* 設置機器 OLYMPUS BX61 落射蛍光顕微鏡

● 対物Lens UplanApo 10×, 20×, 40×, 100×

\* OLYMPUS BH2

● 対物Lens SPlanFL 2×, SPlanApo 4×, 10×, 20×, 40×

自動包埋装置は設置されていないが、手作業によるパラフィン包埋ブロックの作製が可能である。また、薄切・Hematoxylin-Eosin (HE) 染色・特殊染色及び免疫染色が可能である。観察試料を光学顕微鏡標本と電子顕微鏡標本を同時に作製し、光学顕微鏡標本を用いて広視野で分子生物学的な観察像からの知見を得て、電子顕微鏡で高分解能な細胞小器官観察などによってより正確な局在の知見を得ることができる。

#### 5. 超微形態観察の展望

電子顕微鏡観察では超微形態観察のためにグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムを用いて固定を行い、その後エタノールによる脱水を行い60℃での樹脂重合を経て標本作製を行う。このような作業工程により試料作製が行われるため、電子顕微鏡観察では分子生物学的な超微形態観察や物質の局在の証明は対応しがたい。

組織試料を急速に凍結させてそのまま超薄切片を作製する凍結ウルトラミクロトームが設置されれば細胞内小器官の分子生物学的観察に対応は可能である。これは光学顕微鏡標本のクライオスタット（凍結標本）で切片を得て蛍光色素でラベルを行い観察するのと同様な手法である。このように化学固定を行わずに超薄切片を得て目的物質のラベルを行い、観察を行えば細胞小器官のどの部分に蛋白などの物質が発現しているかが電子顕微鏡の高い分解能で観察が可能となる。

現在開発販売されている電子顕微鏡は記録がデジタルデータであるため銀塩フィルムの画像と異なり

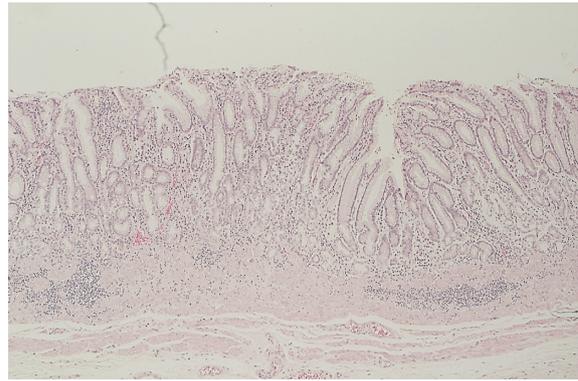


図6 ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

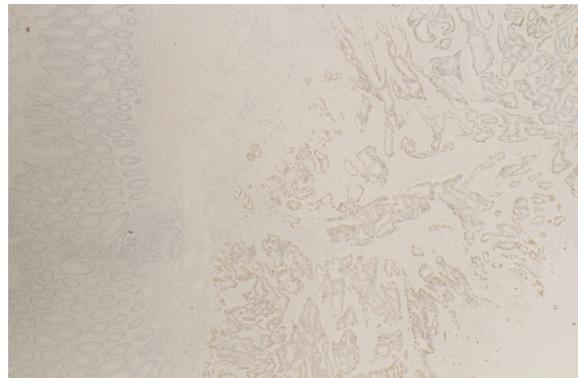


図6 DAB発色による免疫染色



図6 透明骨格標本 マウス前肢部

高倍率での広範囲のタイリングを行った画像取得や観察試料を傾斜させ画像を取得し、切片内の立体構造を得るなど従来の観察像では得られない知見が得られる。さらに、X線解析のセンサーを付加すれば細胞内の元素解析なども可能となる。試料観察室に収束ビーム照射装置やマイクロトームを設置し、走査電子顕微鏡で観察像を得たのちに、観察試料を切削し標本観察を繰り返すことで得られた画像データから立体構築を行う機器も開発販売されている。

光学・レーザー顕微鏡などで核や細胞内・細胞膜といった局在を確認することは可能であるが電子顕微鏡の細胞小器官を観察できる分解能には及ばない。分子生物学的な手法に対応できる機器を設置することは医学・生物学分野のさらなる発展に寄与する。

## 6. 現 状

2018年現在、医学研究支援部門には透過電子顕微鏡は二台設置されている。しかし、1987年設置の透過電子顕微鏡は故障し、メーカーサポートが終了のため2018年度で廃棄予定である。1992年設置の透過電子顕微鏡も2018年度末をもってメーカーサポートが終了し、修理対応外の機器となる。また画像取得のための銀塩フィルムの販売も2020年には終了する。走査電子顕微鏡も2002年に設置されたが、10年のメーカーのリース終了鏡体を購入したものであり、製造稼働からすでに26年が経過しており、製造メーカーから廃棄相当の機種に指定されている。医学部内には機能形態系生体構造医学分野に透過電子顕微鏡が1台設置されているが、医学研究支援部門設置の機種と同型同時期の鏡体であり、すでにメーカーサポートは終了している。

日本大学の他学部にも電子顕微鏡の設置はあるが、理工学部で運用している電子顕微鏡は医学・生物学の観察のための機器構成と異なる。現在、日本大学生物資源科学部や日本大学松戸歯学部からも試料作製・電子顕微鏡観察依頼をうけている。生物資源科学部や松戸歯学部には透過・走査電子顕微鏡の設置はあるが医学部設置の電子顕微鏡と同時期の機種でありメーカー修理終了の鏡体である。

正しい観察像を得るためには正確な標本作製が重要であり、高額・高機能な顕微鏡を用いても観察標本の作製に不備があれば正しい観察像を得ることはできない。医学部の電子顕微鏡による超微形態観察研究が約30年を経過する機器で対応できるのは、鏡体の調整・管理、正確な標本作製、観察像に対する知識と経験に大きく依存している。しかし、機器のメーカーサポートが終了し、画像記録に用いる銀塩フィルムの製造が終了すれば、現在の機器では超微形態観察・記録が不可能となる。

医学部設置の電子顕微鏡試料作製機器として重要なウルトラマイクロームもすでにメーカーサポートが終了し、他の関連機器も設置後30年を経過して

いる。現状を放置すれば、医学部・附属病院の教育・研究・診断のための超微形態観察が不可能になるばかりではなく、総合大学でありながら教育・研究に必須となる電子顕微鏡観察が生物資源科学部や松戸歯学部などの他学部においても不可能となる。電子顕微鏡で得られる分解能を持つ形態観察法は他にない、医学部としてまた日本大学として早期の機器・設備の更新が望まれる。

## 文 献

第22回医学生物学電子顕微鏡技術研修会「夏の学校」 in 軽井沢テキスト 編集：第22回医学生物学電子顕微鏡技術研修会実行委員 2009年

- 1) Akihiro Kishino, Ken Hayashi, Chiaki Hidai, Takeshi Masuda, Yasuyuki Nomura, Takeshi Oshima: XBP1-FoxO1 interaction regulates ER stress-induced autophagy in auditory cells, *Scientific Reports*, 7:4442. doi: 10.1038/s41598-017-02960-1, 2017.
- 2) M. Itoi, T. Jike, D. Nishio-Hamane, S. Udagawa, T. Tsuda, S. Kuwabata, K. Boukheddaden, M. J. Andrus, D. R. Talham. "Direct Observation of Short-Range Structural Coherence During a Charge Transfer Induced Spin Transition in a CoFe Prussian Blue Analogue by Transmission Electron Microscopy" *Journal of The American Chemical Society* (2015) 137, 14686 (8 page)
- 3) ミクロの不思議な世界 監修：宮澤七郎・島田達生 編集：医学生物学電子顕微鏡技術学会 株式会社メジカルセンス 2001年
- 4) 花粉の世界をのぞいてみたら - 驚きのミクロの構造と生体の不思議 - 監修：宮澤七郎・中村澄夫 編集：医学生物電子顕微鏡技術学会 株式会社エヌ・ティー・エス 2012年
- 5) ミクロワールド人体大図鑑 脳と感覚器 考えて感じるしくみ 監修：宮澤七郎・島田達生 編集：医学生物電子顕微鏡技術学会 株式会社小峰書店 2018年