

電子顕微鏡観察のための凍結技法

科学分析支援センター 辻 季美江

電子顕微鏡(電顕)観察における凍結技法は近年、関連する装置の開発・改良とともに発展し普及してきています。凍結法を用いるメリットとして、生物試料は化学固定などの前処理を施さず生きている状態に近い細胞内構造を観察できること、流体・液体状試料は凍結により固化できるため、乾燥や結晶化させずに観察できること、などが挙げられます。試料の構成要素を失うことがないので X 線分析など成分分析も可能になります。

試料の凍結に際しては氷晶の形成・成長を防いで非晶質の凍結状態を得ることが重要です。氷晶は細胞の微細構造を破壊し、また結晶構造が目的の構造を観察する障害になり得ます。氷晶形成を防ぐ凍結方法として代表的なものが急速凍結法と高圧凍結法であり、各装置が科学分析支援センター(分析センター)に導入されています。本稿では各装置と凍結法の特徴、操作の注意点等、凍結技法の実際をご紹介します。

急速凍結装置 (Leica 社 EM CPC) 図 1

原理：液体窒素で冷却した極低温の冷媒に試料を投入し急速に試料温度を下げることで氷晶形成を防ぎ凍結させます。冷媒には沸点と融点の差が大きなエタンやプロパンが適します。分析センターではエタンを使用しています。

良好な凍結深度：試料表面から数 μm

適した試料：単離・精製タンパク質、細胞骨格、細胞小器官など生体サンプルやウイルス、リポソーム、ミセル溶液など。体積が大きなもの是不適です。

試料作製方法の例：ピンセットで挟み装置に取り付けた TEM 用グリッドに、数 μl の試料懸濁液をマイクロピペットでアプライした後、余分な液を濾紙で吸い取りグリッド上に試料液の薄層を作ります。リリースボタンを押すとピンセットがバネで押し出されてグリッドが冷媒中へ急速に落下し試料が凍結されます。この方法は氷包埋と呼ばれています。

ポイント：濾紙で試料液を吸い取る加減が難しく、吸いすぎると乾燥して氷包埋にならず、足りないと試料が厚くなり観察できません。電顕観察しないと成否が判断できないため、観察可能な試料ができるまで何度も繰り返すこともあります。試料は観察に適した濃度に調整しておく必要があります。



図1 急速凍結装置 Leica EM CPC

装置の特徴：付属のデュワーから自動で液体窒素が供給され、冷媒やチャンバ内部は任意の設定温度に自動調節されます。クライオチャンバ内で低温作業をすることもできます。

高圧凍結装置（Leica 社 EM HPM100）

原理：高圧下では水の過冷却温度が下がり粘性が高くなるため、大気圧下より氷晶形成を抑えて凍結させることができます。試料に高圧（2100 bar）の液体窒素を吹き付けることにより加圧と冷却（凍結）を行います。

良好な凍結深度：200 μm 程度

適した試料：大きな試料や、細胞壁があるため一般的に凍結が困難とされる植物等にも適用可能です。動植物組織、細胞懸濁液、高分子溶液（エマルジョン）など。

試料作製方法の例：専用のキャリアと呼ばれる小容器があり（図 2）、この中へ試料を詰め、蓋をするようにもう一枚のキャリアを重ねます。キャリアは内径が 2 mm と 5 mm の 2 種類、深さは数種類あり組み合わせによって 0.2 mm～0.6 mm の深さになります。試料を挟み込んだキャリアはシリンダーという部品でさらに挟み、凍結装置にセットします。ピンを押し入れると自動でシリンダーが装置内部へ導入され高圧凍結が行われて回収容器へ出てきます。

ポイント：キャリア内部に空気が残っていると凍結結果に影響するため、試料に適したサイズのキャリアを選ぶこと、空隙ができないよう充填することが重要です。キャリアより大きな組織はキャリアにフィットするよう試料を切り出し、小さな試料は密に詰め込みます。残った隙間はヘキサデセンやショ糖溶液などを用いて埋めます。試料全体が均一な凍結状態にならない場合も多いので、電顕観察の際に凍結状態の良い場所を探して観察することが必要です。

装置の特徴など：試料をキャリアに詰め込む段は細かい作業ですが、あとはピンを押すのみの操作で、ピンを押してから回収容器へ出てくるまでの工程は 5 秒程度で終了します。高圧がかかる際には瞬間的に大きな音と振動があります。使用準備として装置内のタンクに 40L の液体窒素を充填する必要があります。

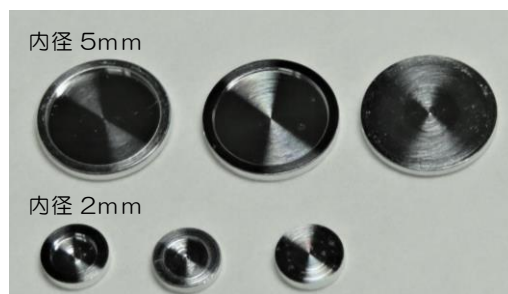


図 2 高圧凍結装置用試料キャリアの例

スラッシュ窒素を用いる方法

上記2つの他に半固体状のスラッシュ窒素を用いる凍結方法があります。液体窒素は沸点が低いいため試料を浸すと周辺の窒素が気化（沸騰）して凍結効率が悪くなりますが、液体窒素を脱気したスラッシュ窒素を用いると、試料を浸漬した際の沸騰が防げます。液体窒素脱気用のスラッシュチャンバは走査型電子顕微鏡（日立 H-3400N）の付属装置であるクライオシステム（Gatan 社 Alto1000）の一部として導入されています。このシステムではスラッシュ窒素の固まり具合をコントロールするのが難しく、試料の用意（切り出し等）をして凍結させる段階で手間取ることがありますが、数リットルの液体窒素があれば使用できる簡便な方法です。

凍結試料の観察法

凍結試料の観察には低温（クライオ）観察可能な透過型・走査型の電子顕微鏡（SEM, TEM）が必要です。分析センター保有機器では TEM は FEI 社 Tecnai G2, SEM は日立社 H-3400N が低温観察に対応しています。TEM の場合は液体窒素タンクが付属している試料ホルダー（クライオトランスファーホルダー：CTホルダー）で試料を冷却しながら観察します（図 3 上）。SEM では試料ステージをクライオ用

に付け替え、冷却された窒素ガスを流し込み試料ステージを冷却することで低温観察に対応します。両者とも X 線分析装置が備わっているため凍結試料の元素分析が可能です。

急速凍結装置でグリッドに凍結試料を作製した場合は、そのまま SEM および TEM で観察可能です。高压凍結の試料はキャリアのまま SEM 観察は可能ですが、TEM には厚すぎるため観察不可能です。生物試料の場合、TEM 観察のために一般的に用いられるのは凍結置換法です。凍結置換とは凍結試料をオスmium/アセトンなど低温の置換液中に置き、試料中の水分を脱水すると同時に構造を固定した後に温度を上げる方法で、通常試料のように樹脂包埋・超薄切片作製をして常温で電顕観察できます。置換液の温度を氷晶成長温度以下の -85°C 程度に保ち 1 日から数日おき、それから室温まで徐々に上げます。凍結置換では凍結試料をそのまま観察する場合と違い失われてしまう細胞成分もありますが、化学固定とは異なる生きた状態に近い細胞内構造は保持されます。また免疫電顕法を行う際に化学固定よりも反応性が保たれている場合があります。

他の TEM 観察のための方法として、高压凍結試料を凍ったままクライオウルトラミクロームにて超薄切片にして低温観察する CEMOVIS (Cryo-Electron Microscopy Vitreous Sections) と呼ばれる方法もあります。凍結以外の処理を加えず TEM 観察できる利点がありますが、技術的に熟練が必要で、電顕観察自体も難しい方法です。

クライオトランスファー

凍結試料を電顕本体へ挿入するといった、装置間の試料の移送はクライオトランスファーと呼ばれます。試料温度が 0°C 以上になれば試料が融解するのは当然のこと、およそ -80°C で氷の再結晶化が始まるとされ、また大気に接することで試料に霜がつくと観察の障害にもなり、試料の移動は軽視できない過程です。凍結試料は基本的に液体窒素中に保っておくことが望ましいですが、電顕試料室へ導入する際には大気に触れずに試料装着・導入ができる特別なシステムが必要となります。

TEM の場合は液体窒素で冷却したクライオワークステーション内でグリッドを CT ホルダーへ装着します(図 3)。CT ホルダーの先端にグリッド装着部分を覆うシャッターがあり、閉じると内部空間は外気から遮断されます。その状態で TEM 本体へ試料を挿入し、シャッターを開けて観察します。



図 3 TEM のクライオトランスファーシステム
上)クライオトランスファー(CT)ホルダー
中)クライオワークステーションに装着した CT ホルダー
下)CT ホルダーへのグリッドの装着操作

SEMの場合は前述のスラッシュチャンバとトランスファーチューブと呼ばれる道具を使います(図4上). 冷却したスラッシュチャンバ内で試料台に試料を載せ, 真空を引いて試料台をトランスファーチューブに引き入れ蓋を閉じると, チューブ内は大気フリーになります. 試料の挿入はクライオ SEMの場合, 試料室の前室となるクライオチャンバから行います(図4下). 液体窒素で冷却したクライオチャンバの試料交換窓部にチューブを装着し, 試料交換棒を押し込んで試料台をチャンバ内へ挿入します. チャンバの真空度が上がれば試料室とチャンバの間にあるシャッターを開け, 棒をさらに押し込んで試料台を試料室へ挿入します.

終わりに

クライオ電顕観察法では, 通常法に必要な数時間から数日に及ぶ前処理は省略できるため, 試料があればその場で凍結して観察することも可能です. しかし凍結結果は百発百中とはいかない点, トランスファーの段階で手間がかかる点, 一度観察した試料の保存は手間がかかるため, 基本的にはその場限りである点など, 実際は通常観察とは違った苦勞があります. それでもインタクトに近い状態を観察できるというメリットは大きく, 凍結法でなければ観察できないものがあります. 凍結観察が成功するか否かは試料によることも大きいですが, 工夫次第で解決できる場合もあります. 通常電顕観察に加えて凍結試料の観察も選択肢に加えていただき, 多くのユーザーに活用していただきたいと思います.

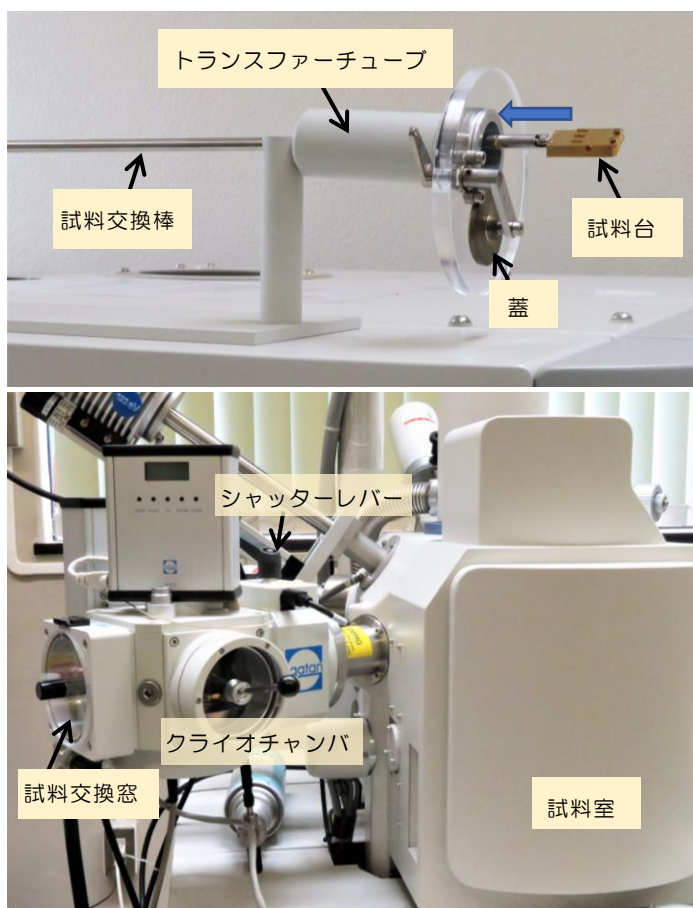


図4 SEMのクライオトランスファーシステム
上)トランスファーチューブ: 試料交換棒を引くと試料台が
矢印方向へ引き込まれチューブに格納される
下)SEM H-3400Nに取り付けられた Alto1000 システム
(クライオチャンバ)