

## 固定法 3. 高压凍結

### Fixation 3. High Pressure Freezing

#### 1. はじめに

現在一般に使用されている急速凍結法では、氷晶形成の乏しい硝子様凍結の領域が表層から 10  $\mu\text{m}$  前後に限られるため、組織の深部域の観察には問題があった。現在よく使用されているプロパンジェット法やヘリウム法では、凍結可能な領域は最大表面から 20~40  $\mu\text{m}$  が限度である。高压下で組織を凍結する高压凍結法では、プロパンジェット法の約10倍の深さまで満足のいく凍結ができるため、様々な応用が考えられるようになってきた。そこで本章では、高压（加圧）凍結の原理、開発の歴史、現状と将来の展望について述べる。

#### 2. 高压（加圧）凍結の原理

生物試料の電子顕微鏡レベルでの良い凍結とは、氷の結晶が電子顕微鏡観察で気にならない程度に十分に小さいことである。常圧下で氷の結晶を 10~15 nm 以下に抑えるには、生物試料を  $-10^4$ °C/秒以上の速度で凍結する必要がある<sup>1)</sup>。図1に示すように、水は 2,050 bar の圧力下で融点が  $-22$ °C まで下がり、理想的には過冷却の状態を  $-90$ °C まで保てる<sup>2)</sup>。この近傍の圧力（図1矢印）下では、氷は常圧での氷（氷I）の状態と異なり、密度が高いため結晶の核が少なくその成長も遅い氷IIと氷IIIの状態にある。この近傍の圧力下で冷却すると、氷Iの状態を経ないため氷の結晶の成長速度を抑えることができ、常圧での凍結速度の2桁遅い速

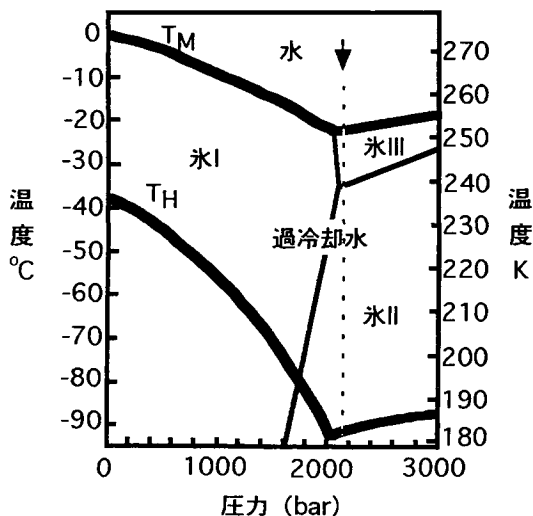


図1 水の状態図。T<sub>M</sub>は水の融点を、T<sub>H</sub>は過冷却の限界を示す。2,100 bar以上の圧力下（矢印で示した点線）では、氷Iの状態を通ることなく水を冷却できる（Kanno *et al.*, 1975<sup>2)</sup>）を改変）。

度での凍結が可能である。つまり、 $-10^2$ °C/秒よりも早く温度が下がった領域まで良い凍結が可能で、凍結可能な範囲を飛躍的に伸ばすことができる。実際、試料の両側から冷却した場合、200~600  $\mu\text{m}$  が上限と考えられている。

#### 3. 歴史

生物試料用の高压凍結装置の理論と設計はスイスの Moor の研究室（Federal Institute of Technology in Zürich）で開始され、最初の報告は1968年である<sup>3)</sup>。最初の商品は1986年に BAL-TEC AG (Balzers) から HPM010 として市販され、2000年1月現在、海外では約30台（米国10台、ドイツ6台など）が、国内でもすでに12台が稼働している。最近ライカ社からも EM-PACT という名前の新製品が発売された。これらの装置で凍結した試料は凍結割断、凍結電顕、凍結置換後の超薄切片観察、凍結走査電顕観察に有効である。

#### 4. 現状

高压凍結装置 HPM010 では、試料を金属製のハット（キャリアー）に入れ、ハットの両側から 1 mm の小さな穴を通して吹き付けられる 100 ml の液体窒素で凍結する構造になっており、液体窒素が吹き付けられている間、ハットの中を約0.5秒間 2,100 bar 以上に保てるようになっていいる。この圧力に達する前に試料が凍結するのを防ぐため、液体窒素を吹き付ける直前約15ミリ秒間アルコールを吹き付け、適当な圧力に達してから凍結が開始するよう工夫されている。

この装置では試料表面で  $-5 \times 10^3$ °C/秒、600  $\mu\text{m}$  の厚さの試料の中央部で  $-5 \times 10^2$ °C/秒の速度で冷却できる<sup>1)</sup>。この結果から考えると、600  $\mu\text{m}$  の厚さの試料を高压下で  $-150$ °C まで冷却する場合でも0.3秒間高压を保てばよい計算になる<sup>4)</sup>。他の急速凍結法に比べると凍結にかかる時間は遅いが、0.3秒というのは多くの現象ではあまり問題にならない時間分解能である。

どのような形のハットを使うかが実用上の問題として重要であり、様々な工夫がされている<sup>5)</sup>。Pelco International 社で市販されているハット（カタログ番号 39200, 01）は組み合わせにより深さを調節できるため、大きさの異なる組織に対応でき、植物材料では都合がよい<sup>6)</sup>。動物材料の場合には、市販のハットの代わりにアルミニウム製のリングに試料を入れ、2枚のアルミニウム製の円板で挟み込んで凍結を行うことにより良い結果が得られている<sup>7)</sup>。

#### 5. 結果

どの材料に関しても共通に言えることは、膜構造がはっきりとしていることである<sup>8)</sup>。化学固定したものと比べ、細胞膜はまっすぐであり、ゴルジ体の中央部の膜間の距離はかなり狭い。また、従来の方法では検出できにくかった細胞質のアクチンフィラメントが比較的容易に検出できる<sup>9)</sup>。抗原性もよく保存されることが多いため、免疫電顕でも応用が広が

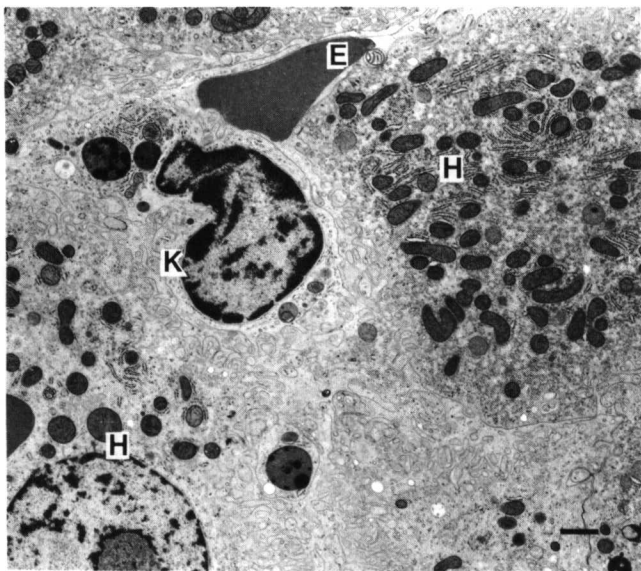


図2 高圧凍結，凍結置換したラット肝臓。硝子様凍結の範囲が非常に広いことが明らかである。E；赤血球，H；肝細胞，K；Kupffer細胞。Bar=1 $\mu$ m。

っている<sup>10)</sup>。

動物組織では材料の切り出しから凍結までの時間をできる限り短く（1分程度），かつ用いるハットの形状等を工夫することにより，80 $\mu$ m前後の厚い硝子様凍結試料が安定して得られる。ラット肝細胞では核膜孔が明瞭に観察され，ミトコンドリアは球形ないし楕円形の種々の不規則な形態を示し，基質の電子密度が極めて高くクリステを識別しにくい。またグリコーゲン顆粒は電子密度が低く，明るい「抜け」として認められる。胃底腺も凍結表面から2腺管くらいは十分に凍結され，膜構造が明瞭である。主細胞や膵臓腺房細胞の酵素原顆粒の開口分泌像も明瞭に観察される<sup>11)</sup>（図2）。

高圧凍結法は従来の凍結法を遙かに凌ぐ厚い硝子様凍結が得られることから，細胞のみならず腺腔内へ分泌された分泌物の流動動態も組織化学的に捉えることも可能となっている。Sawaguchiら<sup>12)</sup>はLowicryl K4M樹脂包埋したラット胃底腺主細胞の酵素原顆粒の特異的染色法を開発し，腺腔内の分泌物も可視化することに成功した。

植物細胞は，外には熱伝導や樹脂の浸透の悪い細胞壁を持ち，内には酸性で様々なタンパク質分解酵素を含む大きな液胞を有するため，動物細胞よりも常圧下で急速凍結可能な範囲が狭く，その後の樹脂置換などの過程も動物細胞に比べ難しいとされてきた。他の凍結法だと細胞の中が満足に凍結できなかったが，高圧凍結で細胞の凍結がやっと可能になった材料も多い。特に根端分裂組織など，組織の表面にない細胞の凍結も可能になり，タバコのような細い根であれば根端のすべての細胞を良い条件で凍結することも可能になった<sup>6)</sup>。

高圧凍結，凍結置換した植物試料で液胞の凍結も可能になり，液胞やその他植物細胞内の膜系の構造に関して新しい情報が蓄積されるようになった<sup>6)</sup>。細胞分裂の最後で見られる

細胞板形成は，形成開始から終了までわずか10分程の間に膜系や細胞骨格の劇的な構造変化がある。高圧凍結を使って従来とは全く新しい細胞板形成のモデルが提出された<sup>13)</sup>。植物では細胞表層の微小管が形態形成に重要である。高圧凍結により微小管と細胞膜との位置関係の定量的な解析が可能になった。また，重合・脱重合中の微小管の端を観察することにも成功している<sup>6)</sup>。

また，この手法は単細胞性の藻類や酵母<sup>14)</sup>などでもすばやく応用されており，従来の急速凍結よりも再現性の高い良い像が得られる。最近，高圧凍結法で作製した試料を使って核や微小管の立体再構成の研究が進んでいる<sup>15)</sup>。

## 6. 展望と問題点

高圧凍結法は，試料の表面のみでなく中央部まで凍結できるので，これからより多くの試料への応用が期待できる。特に細胞壁のような熱伝導の悪い材料で表面をおおわれている細胞でも，細胞の中を凍結可能で，植物や藻類，菌類などにも応用が期待できる。高圧凍結は短時間とはいえ圧力をかけるので，その影響が危惧されるが，高圧または0 $^{\circ}$ Cで脱重合する微小管も高圧凍結でもきちんと像が観察できる。ただ，凍結に要する時間は短い，試料を装置にセットするまでに短くても1分程かかり，この間に引き起こされる人工産物にも十分注意をはらう必要がある。試料作製に十分工夫をすれば得られる情報は計り知れないものがあり，今後の発展が期待できる技法と言えよう。

## 文 献

- 1) Moor, H.: in Steinbrecht, R.A. and Zierold, K. (Eds.), *Biological Electron Microscopy*, Springer Verlag, Berlin, 1987, pp.175-191
- 2) Kanno, H., Speedy, R.J. and Angell, C.A.: *Science*, **189**, 880-881 (1975)
- 3) Moor, H. and Riehle, U.: *Proc. 4th European Regional Conf. Electron Microsc.*, Rome, 1968, Vol.2, pp.33-34
- 4) Dahl, R. and Staehelin, L.A.: *J. Electron Microsc. Technique*, **13**, 165-174 (1989)
- 5) Craig, S., Gilkey, J.C. and Staehelin, L.A.: *J. Microsc.*, **48**, 103-106 (1987)
- 6) 峰雪芳宣, 村田 隆, Giddings, T., Staehelin, L.A.: *Plant Morph.*, **10**, 30-39 (1998)
- 7) 北 重夫: *電子顕微鏡*, **33**(Suppl.2), 73-74 (1998)
- 8) 津山新一郎, 村田長芳: *細胞*, **27**, 320-322 (1995)
- 9) Ding, B., Tugeon, R. and Parthasarathy, M.V.: *J. Microsc.*, **165**, 367-376 (1992)
- 10) 村田長芳, 津山新一郎: *医学のあゆみ*, **188**, 132-133 (1999)
- 11) 菅沼龍夫: *電子顕微鏡*, **32**, 110-112 (1997)
- 12) Sawaguchi, A., Ide, S., Kawano, J., Nagaïke, R., Oinuma, T., Tojo, H., Okamoto, M. and Suganuma, T.: *Arch. Histol. Cytol.*, **62**, 447-458 (1999)
- 13) Samuels, A.L., Giddings, T.H.Jr. and Staehelin, L.A.: *J. Cell Biol.*, **130**, 1345-1357 (1995)
- 14) Oosumi, M.: *Micron*, **29**, 207-233 (1998)
- 15) <http://bio3d.Colorado.EDU/index.html>

村田長芳 (Fusayoshi Murata, 鹿児島大学医学部)  
菅沼龍夫 (Tatsuo Suganuma, 宮崎医科大学医学部)  
峰雪芳宣 (Yoshinobu Mineyuki, 広島大学理学部)