日作紀（Jpn. J. Crop Sci.）74（3）：374 ― 375（2005）

作物の形態研究法：マクロからミクロまで

急速凍結固定―凍結置換法

鈴木克己
（農業・生物系特定産業研究機構　野菜茶業研究所）

光学顕微鏡や電子顕微鏡で組織や細胞内部を観察するためには，切片を作成しなければならない．生の材料を薄い切片にすることは困難であるため，パラフィンや樹脂に包埋し切片にする．包埋のためには，固定・脱水・包埋などの処理を経なければならず，それぞれの過程でアーティファクトを発生する問題がある．そこで，試料を生の状態に近い像で観察することを目的に考案された方法が凍結技法である．光学顕微鏡用にはミクロトームと冷凍機を組み合わせたクライオスタットにより凍結切片が作成される．電子顕微鏡用でも凍結技法が発展した．詳しいことは解説書を参照されたい（第 11 回電顕サマースクール実行委員会 2000）．

1．凍結技法の紹介

電子顕微鏡用に用いられる主な方法には，以下のようなものがある．

（1）急速凍結固定法

試料を急速に凍結することで氷晶形成による構造破壊を最小限に抑え，細胞の構成要素を氷の中に封じ込めて物理的に固定する方法．化学固定よりもアーティファクトが少なく，瞬時に固定することで細胞構造の早い変化を防ぎ固定することができる．急速凍結の方法にもよるが，氷晶による影響が現れないのは表層から数ミクロンであるため，固定範囲が限られるのが難点である．最近では高圧下で急速凍結を行う加圧凍結固定法もあり，従来の急速凍結法よりも細胞の深部までアーティファクトの少ない明瞭な像が得られている．

（2）凍結超薄切片法

急速凍結させた試料から直接電顕用の超薄切片を作製する方法．また試料内の物質の分布を正確に検出するためにも応用されている．凍結ウルトラミクロトームなど特殊な機械が必要であり，綺麗な像を得るためには熟練を要する．

（3）凍結置換法

急速凍結固定法と組み合わせて使用する．急速凍結固定した試料を，低温に冷却し固定剤を入れたアセトンに浸して，試料中の水分とアセトンを置換することで化学的に固定する方法．微細構造の変形，物質の移動・抽出が少ないという特徴がある．高解像力を持った微細形態分析が可能である．包埋後は通常の超薄切片と同様にできるため，凍結超薄切片法と比較すると簡単である．以下，筆者らが行った急速凍結固定 - 凍結置換法の概要を説明したい．

2．方法の概要

（1）試料の急速凍結固定

急速凍結固定には，液体ヘリウムや液体窒素で冷やした金属に試料を圧着させる方法や，液体プロパンなどに浸漬させる方法がある．液体窒素中に金属の筒を入れて，その中に純度の高いプロパンガスを流し込み液化させ，液体プロパンを作成する．特殊な機器がなくても作成可能であるが，液体プロパンはその後の処理が大変危険なため，専用の機器を使用する必要がある．20 年ほど前から，急速凍結固定専用に開発された機器がメーカーから市販されている．この機器では温度管理が自動で行われ，温度はデジタル表示される．冷やす液体窒素が足らなくなると，備え付けられたデュアーより自動的に供給される．使用が終了した液体プロパンは，金属の筒ごと専用のバーナーで燃焼させる．急速凍結装置として LEICA 社製急速凍結クライオプレパレーションシステム EM CPC などが市販されている．筆者らはこれより前に市販されていた KF-80（LEICA 社）を使用していた．新機種でも概要は同じであるので手順に沿って説明する．凍結用の接着剤として 2 M のショ糖水溶液を作成しておく．白金線を小さなループにしておき，それにショ糖溶液を用いて作物体より切り出した試料を貼り付ける．試料が大きいと凍結に時間がかかり氷晶形成による影響を受けるため，なるべく小さくする．試料をつけたループをピンセットに挟み，KF-80 にセットする．液体プロパンの温度を－180℃にセットする．ボタンを押すと，液体プロパンが入った筒の中にピンセットが落下し，白金ループに付けた試料が急速凍結されるしくみとなっている．ピンセットを使って，試料を凍結置換用の金属の籠（SEM 用の臨界点乾燥用の籠）に移し，発泡スチロール容器中の液体窒素の中に入れ，凍結置換用の装置に移す．

（2）凍結置換

続けて凍結置換に移るが，凍結置換用にも専用の機器（LEICA 社製凍結置換装置 EM AFS など）が市販されている．筆者らは CS-AUTO（LEICA 社）を用いていた．この機種の場合，置換温度と時間，昇温と時間，終了後の温度を設定できる．冷却用の液体窒素はデュアーから自動的に

2005 年 5 月 17 日受理．連絡責任者：鈴木克己　〒 470-2351 愛知県知多郡武豊町南中根 40-1
TEL 0569-72-1596，FAX 0569-73-4744，skatsumi@affrc.go.jp

供給される．－90℃に冷やした機器の内部の容器に，四酸化オスミウムの結晶が入ったアンプルを割って，四酸化オスミウムを入れる．4％となるようにアセトンを注入しておく．ここに，急速凍結した試料が入った籠を入れ，容器を閉じて，2日間－90℃にしておく．その後1日かけて－90℃から室温まで昇温させる．室温になったら，機器内部から籠を取り出し，アセトンを入れたガラスシャーレに移す．アセトン中で籠を開け，試料のみをアセトンが入ったサンプル瓶に移す．その後は通常の包埋と同じくプロピレンオキサイドに置換し（アセトンのままでも可），エポキシ樹脂等に包埋する．

切片作成は通常の超薄切片作成と同様であり，染色方法，観察方法等も同様である．先の透過型電子顕微鏡試料作製法（三宅 2005）を参照されたい．

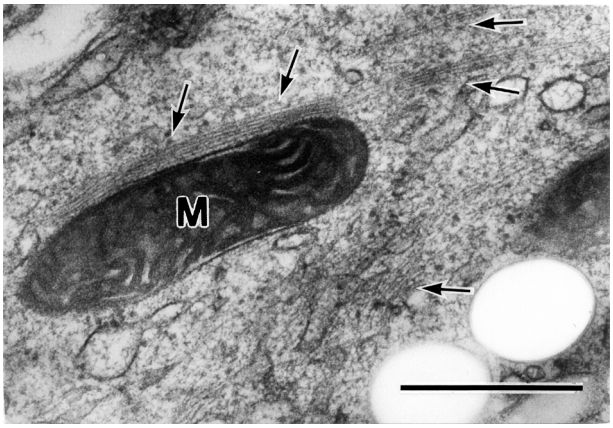
実験を行う上での注意点として，液体窒素は密閉された部屋で用いると大変危険であるため，実験は外気との換気がよい部屋の中で行う必要がある．四酸化オスミウムの結晶アンプルは，液体窒素で冷やすと内部の結晶がアンプルのガラス壁から剥がれてさらさらになり入れやすくなる．四酸化オスミウムは毒物なので取り扱いには十分注意する．

（3）凍結置換法で得られた像

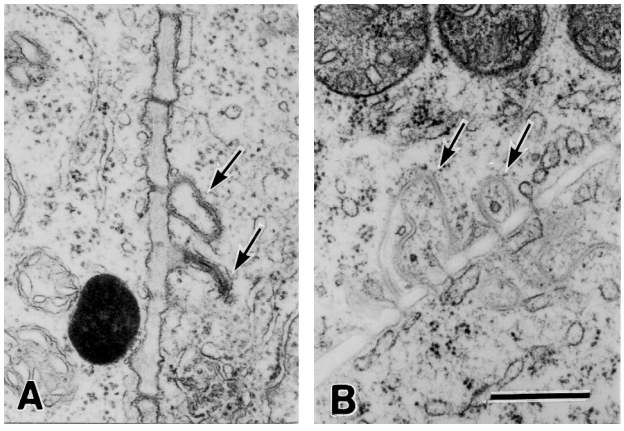
イネの胚盤上皮細胞形成中に細胞壁の微少突起が見られるが，化学固定の場合，細胞壁自体の像が波状となるためアーティファクトであることも考えられた．凍結置換法では，細胞壁の波状はなくなりスムーズな曲線で観察される．二重の細胞膜が微少突起の部分でも明確に観察され，この構造がアーティファクトでないことが証明された（Suzuki ら 1991）．小胞体やゴルジ装置等の膜系は明確になり，ミトコンドリアや葉緑体などのオルガネラでは，その内部が化学固定より濃く染まり，物質の保持がよいものと推測された．しかし脂質体の内部は白く抜けて観察され，置換にアセトンを使用したため，内容物が溶け出したものと考えられた．液体プロパンを用いた場合，綺麗な像は表層より5 μm ほどであり，下部の細胞では氷晶の影響を受けて内部が網目状に観察された．

花粉管では管の伸びる方向と平行に筋状の線の束が観察され，アクチンフィラメントではないかと推測された（第1図）．コントロールとして行った化学固定では，この像を観察することができなかった．*Malva parviflora* の分泌線の細胞では，柄の部分に細胞壁が線状に飛び出ている像が化学固定でも本方法でも観察でき，アーティファクトでないことが示された（第2図）．

凍結置換法は氷晶の影響のため固定できる範囲が限られる欠点はあるものの，微細構造の観察手法として極めて有効である．細胞骨格の保持に優れ，膜系がスムーズに観察でき，化学固定法による像と比較すると，細胞は自然に近い．内容物の保持に優れるため免疫電顕にも応用されている．最近の例ではシロイズナズナの花粉の発達中の液胞の様子（Yamamoto ら 2003）やワタの細胞壁のカロースやショ糖合成酵素の局在の解明（Salnikov ら 2003）に応用されている．



第1図　急速凍結固定―凍結置換法により得られたイネ花粉管．　M：ミトコンドリア，　矢印：細胞骨格．スケール 0.5 μm



第2図　*Malva parviflora* の分泌線細胞．　A：化学固定法．B：急速凍結固定―凍結置換法．　矢印：細胞壁の突起．スケール 0.5 μm

引 用 文 献

第11回電顕サマースクール実行委員会（編集）2000. 電子顕微鏡 基礎技術と応用凍結技法で広がる超微の世界―第11回電顕サマースクール．学際企画，東京．1-258.

三宅　博　2005. 透過型電子顕微鏡試料作製法　日作紀　74：98-100.

Salnikov, V.V., M. J. Grimson, R. W. Seagull and C. H. Haigler 2003. Localization of sucrose synthase and callose in freeze-substituted secondary-wall-stage cotton fibers. Protoplasma 221 : 175-184.

Suzuki, K., T. Taniguchi and E. Maeda 1991. Development of scutellar epithelial cells during rice embryogenesis, studied by chemical fixation and freeze-substitution methods. Jpn. J. Crop Sci. 60 : 161-173.

Yamamoto, Y., M. Nishimura, I. H. Nishimura and T. Noguchi 2003. Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 44 : 1192-1201.