

新しい補助具を用いた確実な連続超薄切片作製法

Reliable Method for Obtaining Serial Ultrathin Sections Using New Small Tools

北 重 夫

Shigeo Kita

株式会社日立ハイテクフィールドディング

要 旨 電子顕微鏡用連続切片は、超薄切片を均一な厚さに超マイクロームで切削すること、切削順に電顕観察する都合から切片どうしが付着したリボン状の超薄切片にすること、リボン状の超薄切片を電子顕微鏡観察用の試料支持台（グリッド）に載せる長さに分割すること、さらにリボン状超薄切片をグリッドに確実に載せることなどの工程があります。本稿では樹脂包埋された生物組織（試料ブロック）について、新しく考案した専用のループと補助具を用いて上記の事柄を解決する手法を紹介します。

キーワード：面だし法、トリミング法、リボン分割法、切片回収法、補助具

1. はじめに

連続切片法では超薄切片を枚数多く処理できるのでスリット型グリッドに載せる方法¹⁾がよく用いられています(図1)。

この方法はグリッドに超薄切片を枚数多く載せるために縦幅を必要最小限に狭くして、横幅をスリットに橋渡しできる幅にします。横幅が足りない場合はスリットの片側に超薄切片を載せます。さらに横幅が足りない場合はスリット内に載せます。

超薄切片は厚さを揃えるために超マイクロームをできるだけ停止しない方法で超薄切りします。また、超薄切り順を確実にするために切片と切片を付着した状態（リボン状）に超薄切りします。さらに、リボン状超薄切片はナイフポートの水面でグリッドに載せる長さに分けます。簡単に思えるこれらの方法は切片の付着が弱いとリボン状を保てなくなり、また、切片どうしの付着が強すぎて継ぎ目部分を分けることができなくて失敗します。

このような問題を克服する方法を作業手順に従って1) 光学顕微鏡試料（準超薄切）作製、2) トリミング、3) 超薄切法、4) 超薄切片の保護、5) 超薄切片を保護専用ループから出す、6) 新考案の補助具を用いた超薄切片回収、7) 支持膜をはる、これらの一連の過程について具体的に紹介します。

なお、試料ブロックの硬・軟・弾性・粘性の性質は試料作製の方法により超薄切りを左右します。つまり、生物組織のブロックの作製は固定→脱水→置換→樹脂浸透→樹脂硬化、の一連の行程で使用した固定剤・脱水剤・置換剤や時間により影響を受けます。成功するにはリボン状の継ぎ目を分ける

技も習得する必要がありますが、都合の良い粘着性を持った試料ブロックを作ることも肝要です。

2. 光学顕微鏡試料（準超薄切）作製

2.1 切削角度を修正するための面出し法

準超薄切は切削面が平面にするために刃先が直線のナイフ（Histo や古くなったダイヤモンドナイフなど機械的に研磨した刃物）等を使用します。セグメントアークは垂直方向にして角度は0°にします。ナイフブロックの垂直軸角度（回転角度）は0°に設定して組織が削れるまで面出しをします(図2左)。

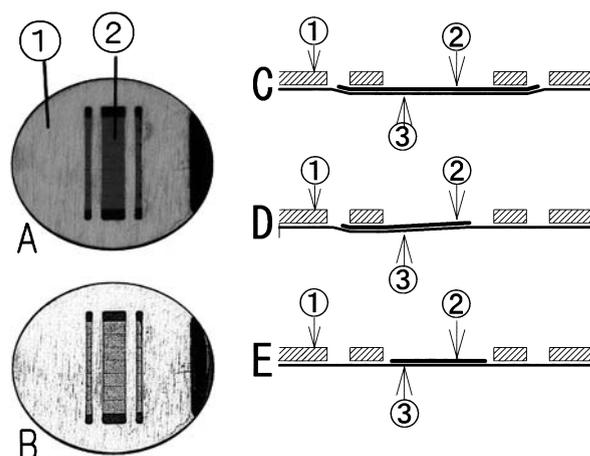


図1 普通に用いられている方法

A: 特殊3グリッドに開いたスリットに超薄切片を載せた像、B: Aをクリアーに見られるようにイラストタッチのプリント、C: 超薄切片をスリットに橋渡しに載せた断面図、D: 超薄切片をスリットの片側に載せた断面図、E: 切片がスリット内の支持膜に載せた断面図

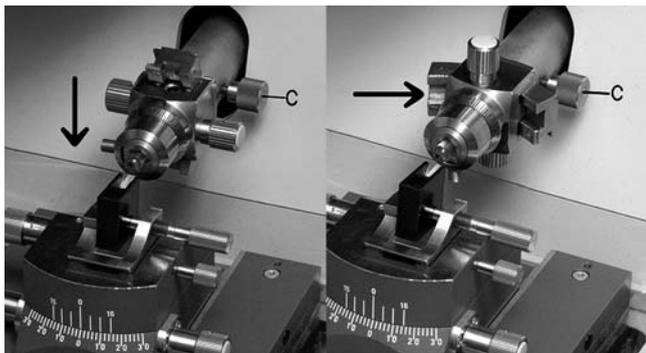


図2

左：超マイクロトームに試料とナイフを固定
セグメントアークは垂直方向にして角度は0°にします。ナイフブロックの垂直軸角度（回転角度）は0°に設定。（c）はセグメントアークを固定するクランピングねじ。
右：切削角度を修正するための面出し法
（c）を緩めてセグメントアークを反時計回しに90°（目盛が無いので目測）回転させて締めます。次に切削面とナイフ刃の横方向の隙間はナイフブロック回転つまみで平行にして面出しをします。

ナイフブロックを手前に少し移動して、試料アームの固定ネジ（c）を緩めてセグメントアークを反時計回しに90°（目盛が無いので目測）回転させて締めます（図2右）。

次に切削面とナイフ刃の横方向の隙間はナイフブロック回転つまみで平行にして面出しをします。しかし、切削面はわずかな弧に切削されていますので、隙間は平行でなく中央が狭く左右の隙間を同じに調整します。

マイクロトームを用いてブロックの上下面を正確に平行にトリミングするために、必須の作業です。この作業で設定したナイフブロックの回転角度は、「3.1 超マイクロトームによるトリミング」で再度面出しに使用しますので変えないください。

2.2 トルイジンブルー染色

目的の組織細胞が表面に露出されているかを確認するためにトルイジンブルーまたは、メチレンブルー染色切片を作って検鏡します。

3. トリミング

試料ホルダをセグメントアークからトリミング台に移し、薄切面にグリッドを載せて確認しながら安全カミソリ等で少し広めにトリミングをして、セグメントアークの元の位置に戻します。

3.1 超マイクロトームによるトリミング

ここでトリミングした面を縦長に向けますが、試料の回転はセグメントアークのシャフトを回転させます。手順はアームに付いているクランピングねじ（2）を緩めてセグメントアークのシャフトを回転させ、超薄切面を縦長向きにしてクランピング（c）を締めます（図2右）。

さて、切削面は弧に切削されていますので、試料回転させたことにより切削面はアーム軌道から外れます。修正する場合

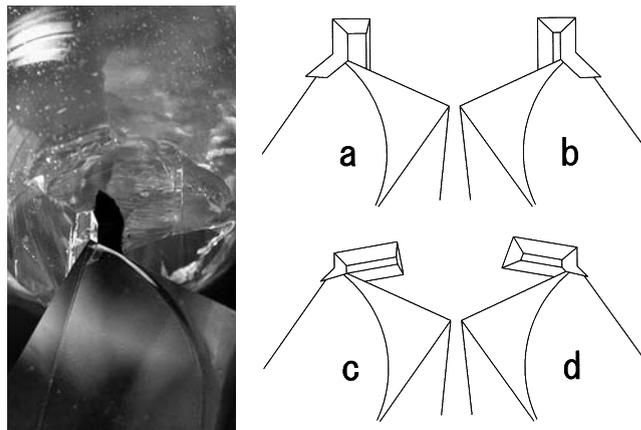


図3 左：ガラスナイフでのトリミングの拡大像。右：a. 左側に刃先ができたガラスナイフを用いる。b. 右側に刃先ができたガラスナイフを用いる。c. セグメントアークを目測で時計回りに80°回転させて左側に刃先ができたガラスナイフを用いる。d. 時計回りに20°回転させて右側に刃先ができたガラスナイフを用いる（図2右を参照）。

は準超薄切したナイフ角度で行います。この時点でナイフブロックの回転角度は準超薄切した時と同じに保たれています。外れはわずかですので、超薄切（厚み100 nm位）で切削して面出しをします。組織が試料ブロックの中心にある場合は必ず行う必要はないのですが、中心から外れた場所に包埋されている場合は行います。

3.2 トリミング専用刃物（Ultratrim）とガラスナイフ

真直ぐなりボン状に超薄切片にするために、トリミング面の上下の辺の角を正確に平行にする必要から、超マイクロトームで仕上げをします。準超薄切りしたナイフはUltratrimまたはガラスナイフに交換します。ガラスナイフは刃先を作る最後の対角に割る行程で、左の角に良い刃先と右の角に良い刃先を作り左右の角を使い分けて使用します。

3.3 上辺のトリミングの操作

図3におけるa, b, c, dは行程順を示しています。トリミングの斜面を45°にするためにナイフブロック上部を時計回り45°に回転させます。ハンドホイールを回転して試料ブロックをナイフ刃先の高さで停止します。顕微鏡下でナイフステージの左右駆動つまみと前後駆動つまみでナイフの左の角をトリミング左側（上斜面）に移動させます。試料ブロックをハンドホイールで上下させて、ナイフブロックを右方向に1 μm前後に移動して左側を切削します。次はナイフブロックの回転軸を元の0°に戻します。Ultratrimは反時計回り45°に回転させます。ガラスナイフの場合は右側用のナイフに取り換えて45°に回転させます。下辺のトリミングの操作（b）は上側のトリミングの操作と対照的に操作します（図3a, b）。

3.4 超薄切面の左右辺をトリミング（図3c, d）

リボン状の超薄切した順番と枚数を数えるためにトリミング面の上の辺を短くするために、左側は時計回りに目測で80°回転し削り、さらに時計回しに20°回転させて右側を削ります。

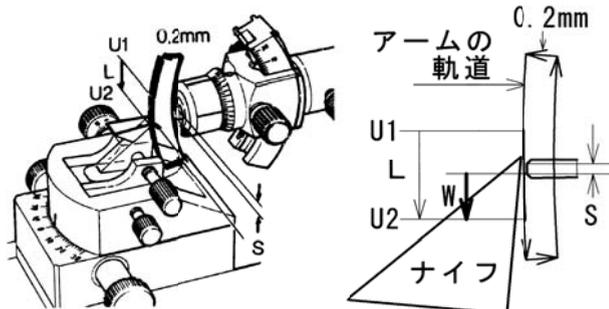


図4 カuttingウインドウと切片厚みを変更がでる範囲
左：U1 から下方にU2 までがCuttingウインドウ。
右：左の模式図です。試料が刃先を通過時点S からU2 までのW の↓が切片厚みを変更がでる範囲。

4. 超薄切法

超薄切り用のダイヤモンドナイフと取り換えます。クランピング(c)を緩めて、セグメントアークのシャフトを顕微鏡下で反時計回りに回転させ超薄切面の下辺を水平にしてクランピング(c)を締めます(図2右)。Cuttingウインドウの終了位置を通常よりは下の方に設定します(図4右)。

コントロールユニットのアプローチでナイフ刃を超薄切面に近づけます。超薄切面とナイフ刃の隙間をナイフブロックの回転駆動つまみで平行にします。さらにナイフを超薄切面に近づけると隙間に干渉色が見えます。リボン状に超薄切するにはナイフ刃先に超薄切面の上下辺の角をナイフ刃に平行にすることが肝要です。超薄切を始めると切片と切片が付着してリボン状に超薄切されます。リボン状の超薄切片はグリッドに載せる長さにします。リボン状超薄切片を刃先から離す場合に次の様な問題点に遭遇することがあります。

超薄切を停止して再起動させると停止中に超薄切面の乾燥が進み超薄切面とナイフ刃先に隙間ができて超薄切片が何枚も切れないことがあります。

そこで、再起動までの時間を順次短くしていくと刃先に付着している超薄切片は試料薄切面によりナイフ背面に引き込まれます。さらに再起動までの時間を短くすると折超薄切片は切れない(空振り)で刃先に付着している超薄切片が刃先から離れることがあります。

4.1 超薄切片のリボンを望みの場所で分割する方法

連続超薄切に(空振り)を組み入れます。空振りを起こさせるには経験で20 nm 以内の厚みで切削すると起こります。20 nm を超えて厚くすると刃先に切片らしき切屑が実体顕微鏡下で見えます。さらに厚みを増しますと切片が切れてきます。これはナイフの鋭利さと試料ブロックの硬さによって違いがあると思います。

例えば、図5に示す如く、70 nm 厚の超薄切片10枚をリボン状に切ります。次の11枚目は10 nm 厚で(空振り)させます。そして12枚目は70 nm に戻り超薄切りすると、12枚目は70 nm より厚く切れます。このことを踏まえて12枚目を60 nm 厚の超薄切片1枚を超薄切りして13枚目から21枚目を70 nm 超薄切りします。

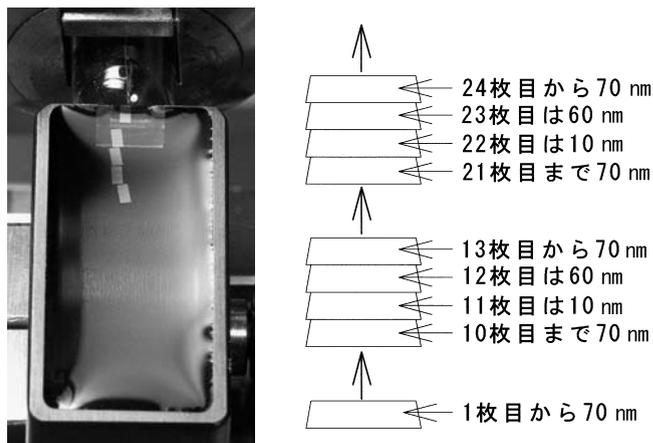


図5 リボン状に超薄切り
左：超薄切景。右：試料送りを変更する箇所。

枚目を70 nm 超薄切りします。次に10 nm 厚で(空振り)させます。その次に60 nm で超薄切片を1枚切ります。そして、元の70 nm の超薄切り9枚超薄切りをして、停止しないで連続で繰り返します。

超薄切面が乾燥する試料では空振りのための厚みを0 nm に設定にするとうまくいきません。使用する試料に効果が出ると空振りのための厚みがあると思います。空振りの厚みは試料ブロックの状態、ナイフの切れ味、超マイクロームの状態などで変わります。

厚みの変更タイミングは超薄切片が切れた直後からCuttingウインドウ終了前までの間に図面4のwの間に行います。

この空振り法は超マイクロームの新旧により差があります。超マイクローム(ライカEM UC6)を使用した場合、タッチパネルのコントロールユニットに5つのメモリ保存されている切削速度と送りのパラメーターは、常時表示されており、ワンタッチで超薄切削を切り換えることができますので便利です。メモリAには70 nm、メモリBには10 nm、メモリCには60 nm を記憶させてA → B → C → A を繰り返します。

旧式のReichert Ultraacut Nの超マイクロームの場合、切片の厚み設定はUltraとSemiの二つのみです。旧式の機種ではUltraには70 nmをSemiには最小の0.01 μm (10 nm)を設定します。Cuttingウインドウの設定の違いもあります。自動で超マイクローム運転開始します。厚さUltra (70 nm)の1枚目～10枚目の超薄切片が切れた直後からCuttingウインドウ終了前までに、厚さSemi (10 nm)に変更して11枚目の超薄切り(空振り)を待っている間に、Ultra (70 nm)をUltra (60 nm)に切り替えて置きます。Cuttingウインドウ終了前までに、Semi (10 nm)からUltra (60 nm)に変更して、12枚目の超薄切片が切れた直後からCuttingウインドウ終了前までにUltra (60 nm)をUltra (70 nm)に変更して13枚目～21枚目まで9枚の超薄切片を切ります。以上の工程を繰り返して超マイクロームは停止することなく超薄切りをします。

4.2 切片をリボン状に切るための粘着処理

超薄切片と超薄切片の付着が悪くリボン状に切削できない場合は、トリミング面と上下斜面（のり面）をネオプレン W 0.5%～2%液で粘着処理します。

その方法はまず試料ホルダをセグメントアークから外してトリミングブロックに付替えます。濾紙にネオプレン W 0.5%～2%溶液を浸して超薄切面を濾紙で擦らないようにトリミングの斜面に溶液を流しますが、余分な溶液は即座に吸収するようにトリミングの斜面近くに濾紙を当てておきます。乾燥は60分以上必要ですが、一晩待つことをお勧めします。この粘着処理はエポキシ樹脂が硬くて超薄切片に粘着性を失くした試料ブロックに効果があります。樹脂が十分浸透していない試料では溶媒のトルエンに超薄切面が侵されかえって悪くなります。

樹脂包埋について、リボン状に超薄切りするには軟らかい包埋がよいとされています。ここで採り上げる軟らかいとは樹脂の配合比（例、LuftのA:B比率）ではなく試料作製に用いる置換剤のプロピレンオキサイトやエチルアルコールの有機溶媒や固定出来なかった組織の残留物などにより樹脂の不完全重合物による粘着性のことです。有機溶媒を極力排除した試料ブロック作製をすると粘性は減少します。また、Luftの方法でプロピレンオキサイトをQY-1（n-ブチルグリシジルエーテル）に置き換えたレシピでは切片どうしの付着は殆んどなくなります。これはQY-1とエポキシ樹脂が一緒に重合するからです。QY-1を使用しても粘性が多い場合は脱水に用いた溶媒が残留に因るものです。

5. 超薄切片の保護

超薄切時は気配りして順番を記憶しておきます。保護は超ミクロトームを停止して行います。超薄切時に空振りさせた部分を探針や睫毛等で離してグリッド1枚分のリボン状にして用意した専用ループで囲みます。専用ループはナイフポートの水面に切削された超薄切片をグリッドに載せる時に起きる振動等から薄切順やリボン状を保護します（図6）。ナイフポート内で使用できる専用ループは8個です。8個以上を必要の場合は取り出し用ループを使用してナイフポート外に移して一時保護します²⁾。

6. 超薄切片を専用ループから出す。

超薄切片を保護している専用ループから外に出します。方法1は疎水加工した専用ループですので水面から上に離します。方法2は取り出し用ループ（直径0.1mmの細い針金、直径3.5mm）で保護している専用ループから取り出します（図7）。

7. 新考案の補助具を用いた超薄切片回収

超薄切片は押し付け法でグリッドに載せます。押し付け法はグリッドと超薄切片が最初に接触させることが必要です。押し付け法に最良の状況を作るために考案した専用の用具を

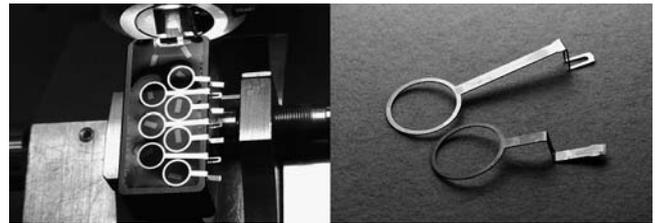


図6 超薄切片を保護
左：ナイフポートの水面で超薄切片をループで保護 右：ループ

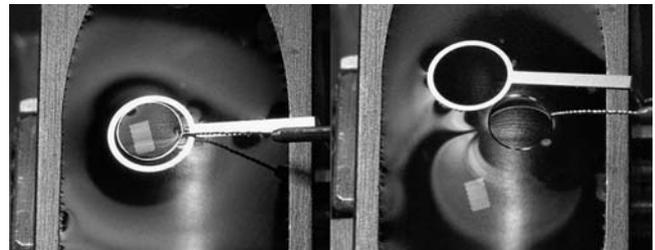


図7 保護ループの外に移す。
左：取り出し用ループが保護専用ループの内側に着水させて超薄切片を取り出す。右：超薄切片を取り出しループからナイフポート水面に移すところ。

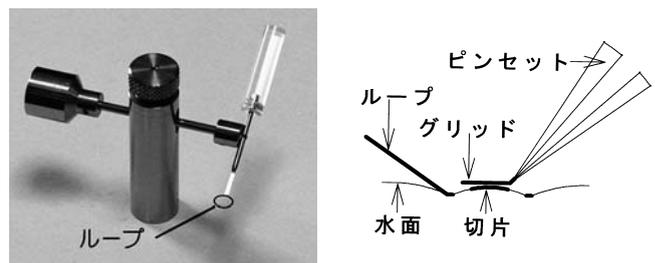


図8 リボン状の超薄切片をグリッドに載せる補助具
左：補助具の全景。右：補助具を使用した押し付け法の断面図。ループで水面を押し下げることにより切片がグリッドに最初に付着するようにした点が重要である（補助具の入手先：北重夫、電話 042-466-3526）。

使用します（図8）。この用具は内径4mmの輪を備えています。輪内の中心に水面のリボン状の超薄切片を捕らえます。輪内のリボン状超薄切片は水面を探針で動かして操作します。用具の輪を下げると輪内の水面は表面張力で、中心が高い球面三角形に成ります。球面三角形の頂点に浮かせた超薄切片にグリッドをピンセットで摘み水平に押し付けます²⁾。グリッドは最初に超薄切片に接触するので、リボン状を乱れさせないまま超薄切片を付着させることができます（図9）。

超薄切片を付着させたグリッドを水面から支持膜上に移すには、グリッドの下側全面に水が付着していることが必要です。もし水滴が下側全面に付着していないと超薄切片は紛失しますので、グリッドの下側全面に水の付着を確実にするためには、水面で数秒間グリッドを水になじませてから水面から離し、支持膜に移します。グリッドは特殊3スリットを予め外縁を一部上に曲げたものを、濾紙に並べて2%コロジオンを滴下して表面をコートしておきます。

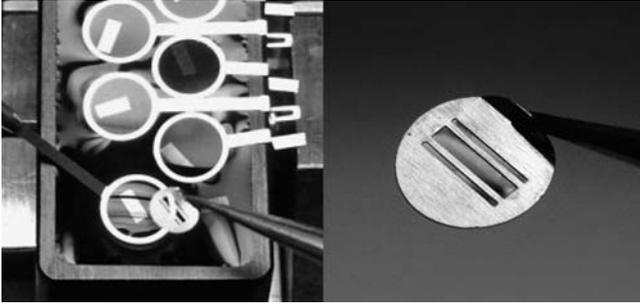


図9 リボン状の超薄切片をグリッドに載せる。
左：補助具のループと右からピンセットで掴んだグリッドが見えます。右：リボン状の超薄切片を押し付け法でグリッドに載せて水と共に支持膜上へ移します。

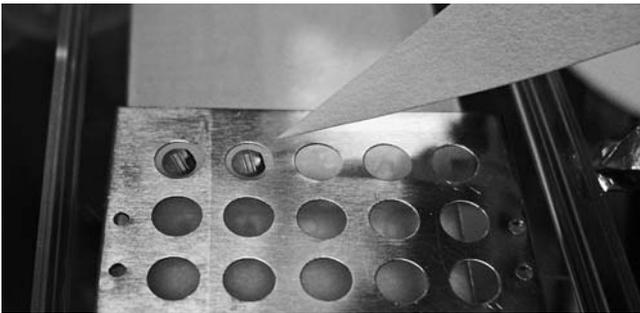


図10 支持膜をはる。
グリッドは超薄切片を水と共に支持膜の上に置きます。水は濾紙で吸収します。

8. 支持膜をはる

ナイフポートから水滴と共に持ち出したグリッドは用意した4 mm 径程度の孔に支持膜を張った上に水平に置きます。支持膜に溢れた水は濾紙により吸いとります (図10)。

支持膜の作製は次のように行います。直径100～150 mmのシャーレに室温より高い30°C～40°C 温度の純水を満たし、水面が静止してから、2%コロジオン酢酸イソアミル溶液を駒込ピペット等でシャーレの中央に一滴水面近くで滴下します。水面にできた膜に用意した4 mm 径の孔を開けた専

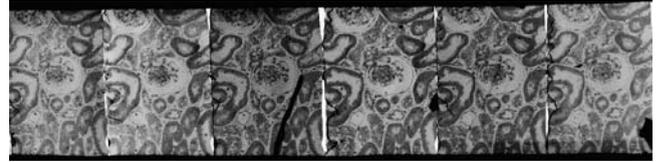


図11 この方法で作製した連続超薄切片の例 (マウス腎臓)

用の台を上方から押し付けます。台の周りの膜は取り除き台を水面から上げます。支持膜は台の4 mm 径の孔に張ることができます。

9. おわりに

本法により作製した連続超薄切片の例を図11に示します。本改良法により、マイクロームは停止しないので均一の厚さの超薄切片を得ることができます。また、空振りを取り入れることで、リボン状に超薄切りしながら、分割する継ぎ目部分を作ることができます。連続超薄切片作製上、実際最も問題となることは、得られた超薄切片をいかにダメージなく確実にグリッドに回収することでありましたが、紹介したように、超薄切り順に仕分けして超薄切片をループで保護することにより、リボン状は保たれ、さらにグリッドに超薄切片を載せるための専用の補助具を用いることで、従来の方法より正確な位置に確実に載せることが可能となりました。この方法が研究の一助となれば幸いです。

謝 辞

本原稿の執筆にあたり、有益なアドバイスをいただきました千葉大学真菌医学研究センターの山口正視博士に心から感謝致します。

文 献

- 1) Yamaguchi, M., Okada, H. and Namiki, Y.: *J. Electron Microsc.*, 58, 261-266 (2009)
- 2) 北 重夫：病理と臨床, 2, 1115-1119 (1984)