

電子顕微鏡生物組織の切片に対する酢酸ウランに代わる 新規重金属剤の染色効果の検証

利用者：^a神戸大学 Pyoyun Park^a

研究支援者：大阪大学 井上加奈子

【研究目的】

生物試料を透過型電子顕微鏡を用いて観察する際、切片を酢酸ウランで染色することが不可欠となる。しかしながら、観察に必要なウランは放射活性を有するため日本ではその管理と使用が制限され透過電子顕微鏡を使った研究環境が悪化している。このため酢酸ウラン染色液に代わる非放射性重金属染色剤の開発が必要である。本課題では、生物組織の隣接超薄切片を用いて、4種類の非放射性重金属染色剤（塩化ハフニウム、塩化サマリウム、酢酸ガドリニウム、白金ブルー）の染色効果を評価することを目的とした。

【成果】

ラット肝細胞の超薄切片に各種染色液を酢酸ウラン染色液と同じ手順で処理して透過型電子顕微鏡で観察した結果、塩化ハフニウム、塩化サマリウム、酢酸ガドリニウムの3種類で染色ムラ、コンタミネーション、細胞破壊が生じることなく好染色される結果を得た（図1）。さらに、各種細胞小器官の染色性を相対的TEMコントラスト比法(1)により詳細に評価した結果、塩化ハフニウムや塩化サマリウムを処理した細胞では、一部の細胞小器官で染色性が低下した。これに対し、酢酸ガドリニウムを処理した細胞は、全ての細胞小器官の膜系や核のヘテロクロマチン、ミトコンドリア、アクチン繊維を含む細胞骨格系に対して好染色性を持つことが明らかとなった。さらに、超高压電子顕微鏡観察に用いる厚切り切片に対する染色効果についても検討し始めた。現在、塩化ハフニウムの結果が得られており、酢酸ウラン染色液に匹敵する高い染色効果を有することを確認した（図2）。

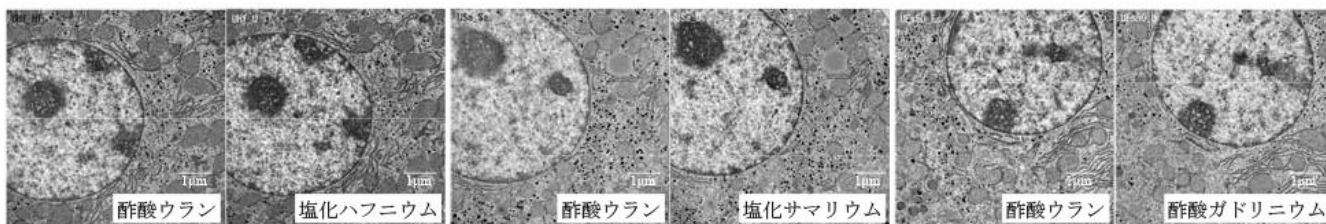


図1 ラット肝細胞超薄切片に対する塩化ハフニウムと塩化サマリウムと酢酸ガドリニウムの染色性評価

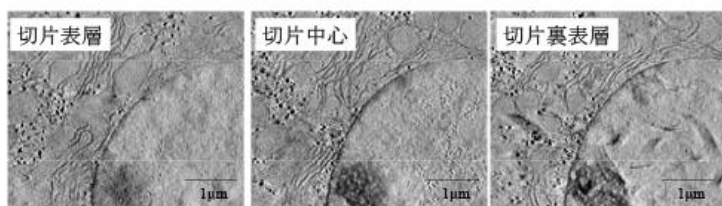


図2 塩化ハフニウム染色した2μm厚膜切片の断層像

【支援実施機関からのコメント】

本課題では、染色効果比較を隣接切片（同質切片）を用いて解析しているため、染色剤の浸透性や染色性を厳密に評価することができている。この試料作製は非常に高い技術・時間・労力が求められる。それをクリアして得られたデータはユニークであり、高い信憑性を有する。今後は、『超高压電子顕微鏡観察用厚膜切片の染色に対するガドリニウムの染色効果』、『染色液の有効使用期限の調査』、『哺乳類の器官別染色効果や植物、糸状菌、バクテリア、ウイルス、昆虫などの幅広い生物試料に対する染色性評価』を検討することで利便性、汎用性、安全性のバランスの良い染色剤の開発が期待される。この画期的な技術は、透過電子顕微鏡による生物試料の染色観察にイノベーションをもたらすことを確信する。

【参考文献等】

[1] Kaku, H., Inoue, K., Muranaka, Y., Park, P., Ikeda, K. (2015) Rapid contrast evaluation method based on affinity beads and backscattered electron imaging for the screening of electron stains. *Microscopy*, 64: 361-368. doi: 10.1093/jmicro/dfv041.