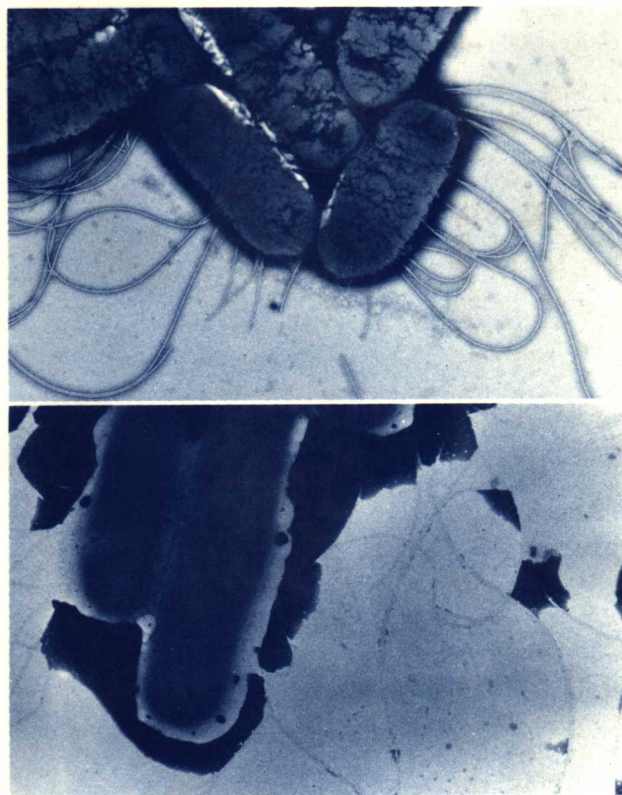


山田英智・石川春律・野々村禎昭 編

微生物学における 電子顕微鏡技術 [下]

天兎和暢・小池聖淳 編著



学会出版センター

5
1

66.605

医学・生物学のための電子顕微鏡実験法—4

山田英智・石川春律・野々村禎昭 編

微生物学における 電子顕微鏡技術 [下]

天児和暢・小池聖淳 編著

学会出版センター

医学・生物学のための「電子顕微鏡実験法」 4

微生物学における電子顕微鏡技術(下)

ISBN 4-7622-5285-8

©1982 年 7 月 25 日 初 版

定価 2,800 円

検 印
省 略

編 著 者 天児和暢・小池聖淳

発 行 者 学会出版センター

印 刷 所 一ツ橋印刷株式会社

製 本 所 誠製本株式会社

株式会社 学会出版センター

113 東京都文京区本郷6丁目2番10号

電話 03-814-2001(代表)・振替 東京 6-71057

挿図・伊藤允三／製版・大森製版所／カバー・平版印刷／装幀・吉永聖児

カバーの写真説明

グラム陰性菌のネガティブ染色像。理想に近い状態で染まった例(上)と染色がうまくいかなかった例(下)。(微生物学における電子顕微鏡技術<下> p.84参照)

編者紹介

山田 英智（東京大学医学部解剖学教室）

石川 春律（東京大学医学部解剖学教室）

野々村禎昭（東京大学医学部薬理学教室）

医学・生物学のための

「電子顕微鏡実験法」刊行にあたって

電子顕微鏡は、光とレンズとによって拡大像を見る光学顕微鏡の分解能を越えて、より微細な形態をとらえようとして開発されたものである。ドイツのSiemens社のRuskaによって初めて実用化されてからほぼ半世紀が過ぎた。その間に、電子顕微鏡の性能は年々向上し、より安定で、高分解能の使いやすい機械が次々とつくりだされてきている。この点に関して、我が国メーカーの努力と功績はきわめて大きい。最近の傾向は、他の電気機械と同様に、コンピューター制御による自動化に向かっており、誰が使っても上手下手なく電子顕微鏡写真が撮れるようになりつつある。

一方、医学・生物学の研究分野での電子顕微鏡法の普及は著しく、形態を取扱うすべての分野で必須の研究機器となっているにとどまらず、生理学や生化学などの関連分野でも補助手段として広く用いられるようになっている。そのうえ、電子顕微鏡は元来が試料をつくる物質と電子との相互作用を利用したものである。この相互作用の結果は、透過電子顕微鏡像に関与する散乱電子のほかに多種のものがあつて、それぞれがまた試料の性質の一面を表すものであるから、最近の電子顕微鏡は、これらについてもできるだけ活用しようように工夫されている。特性X線を利用する局所元素分析などはその例であり、電子顕微鏡の応用範囲はますます拡大されている。

このように、かつては特定の研究者の高度のテクニックを必要とした電子顕微鏡も、今ではありふれた研究機器の一つであり、簡単に誰もが使用できるよ

うになりつつある。しかし、電子顕微鏡を使って何を、どう調べるかは研究者の責任であり、また電子顕微鏡がもつ性能を発揮させ、その可能性を引き出すのも研究者の問題である。そこに、電子顕微鏡の使い方、試料の作製法をふくめて研究者の努力と独創性が要求され、また得られた結果についての鋭い観察眼と正しい解釈力とが必要とされるのである。

上述のような現状をふまえて、複雑多岐な電子顕微鏡の使用法と試料作製法とを、研究者が目的に応じて活用できることを願ってこのシリーズが企画された。そのため、執筆者には現在我が国の第一線で活躍されている研究者にお願いし、それぞれの手技や作製法について平易に解説していただくとともに、執筆者の経験に基づいて可能なかぎり各方法の長所や短所、問題点やコツなどを指摘してもらうことにした。

これらの実験書が、電子顕微鏡を使った実験の具体的な指針ないしは研究への示唆として活用されることを期待している。

山 田 英 智

は　じ　め　に

電子顕微鏡の応用が、微生物学の発展に大きく寄与していることは周知の事実である。一枚の電子顕微鏡写真が、微生物学を一段と進歩させた例は数多い。電子顕微鏡の利用者も年を追ってふえ、いまや電子顕微鏡の技術は、かつてのように限られた研究者のもつ特殊高等技術ではなく、ほとんどの研究者が手軽に使うことのできる技術としての地位を占めるようになってきている。しかしながら、これまでに出版された電子顕微鏡の技術書は、細胞学の立場で書かれているものが多く、微生物学領域での研究者にとっては必ずしも適切な助言を与えてくれるものではなかった。微生物学は、真核細胞である真菌から、原核細胞である細菌、さらにウイルスに至るまでの広い範囲の生物を対象としている学問で、これらの生物の取扱い方法はそれぞれ著しく異なっている。したがって、電子顕微鏡での取扱いもまた、細胞学での技術とは異なった面が多いのである。にもかかわらず、微生物に関する電子顕微鏡技術について、単独で書かれた技術書がないのは大変残念なことであった。今回、学会出版センターから電子顕微鏡についての総合的な技術書が刊行されることになり、その一つとして微生物の電子顕微鏡での取扱いに関する本を出すことを思いついたのもこのような事情を考えてのことである。

執筆者は、いずれも当代の日本における微生物学領域での電子顕微鏡学のエキスパートであり、その豊富な経験をもとに独自に開発、工夫をこらしたそれぞれの分野での技術をもっておられる方々である。各章を一読されれば、微生物学領域での電子顕微鏡技術の特殊性がよくうかがわれるものと思う。内容に

は各章について重複する面が多いと思われるが、電子顕微鏡技術として共通の面があるのは止むを得ないことである。それゆえ、あえて共通部分を除くようなことは行わなかった。各執筆者によって記されたまえがきの部分は、それぞれの研究者の電子顕微鏡に対するとり組み方が現われており興味深い。

本書は、電子顕微鏡技術のシリーズの一部として刊行されるものであるため、他の巻に記され、かつ微生物学に特有な技術でないものは、あえてこの本には含ませなかった。たとえば、電子顕微鏡の本体に関する理論、取扱いについては一切記していない。写真処理法、画像処理法なども有効な技術ではあるが、微生物学領域で特有な工夫が必要なものではない。これらは、本シリーズの一巻として出版される予定であり、それは微生物学へも直ちに応用可能であろうと考えたからである。

微生物の分野、特に細菌学では、細胞成分を分画調製する技術が進んでいる。そして、これらの分画した材料についてその形態を観察することは、しばしば行われ、またそれらの成分に対しての抗体を作製し、免疫電子顕微鏡法によってその所在の確認を行うこともよく用いられる技術である。その意味で、細菌細胞の分画調製法は電子顕微鏡技術とは密接に関連した技術と考える。本書では、このような観点から、細菌菌体成分の分離調製法を、その方面の研究者に記していただいた次第である。

このような独創的な微生物に関する電子顕微鏡技術書を計画されたのは、前佐賀医科大学副学長小池聖淳博士である。残念ながら、1979年12月、博士は計画の途中で急逝された。生きておられれば、もっと適切なまえがきを書いていただけたものと思い、残念でならない。同博士の意図されたものにどれだけ近づけたかは自信はないが、一応の完成をみ、ここに出版される運びになったことを御報告するとともに、同博士の御冥福をお祈りする次第である。

1982年1月15日

天 児 和 暢

目 次

刊行にあたって	山田英智	i
はじめに		iii

超 薄 切 片 法

6 真菌学への応用	大隅正子	3
6-1 酵母の取扱い方		4
6-2 固 定		8
6-3 脱 水		22
6-4 包 埋		22
6-5 酵母細胞の透過電子顕微鏡像		25
6-6 試料作製中で停止するときの操作		35
6-7 試料の良否を早急に知りたいときの包埋		36
文 献		36
7 細菌学への応用	川田十三夫	39
7-1 細菌細胞の基本構造		39

7-2	固定前の細菌の取扱い方法	43
7-3	固 定	44
7-4	脱 水	48
7-5	包埋と薄切	48
7-6	電子染色	49
7-7	細菌の超薄切片の観察, 像の解釈と実例	50
	文 献	58
8	ウイルス学への応用	新居志郎 61
8-1	ウイルス観察材料の種類	61
8-2	ウイルス感染材料作製上の注意	61
8-3	単層培養細胞の電子顕微鏡用試料作製法	62
8-4	浮遊培養細胞の電子顕微鏡用試料作製法	76
8-5	ウイルス粒子およびその構成成分の電子顕微鏡用試料作製法	76
8-6	超薄切片法によるウイルスの電子顕微鏡観察上の注意	77
	文 献	78

ネガティブ染色法

9	ネガティブ染色法	天児和暢 83
9-1	ネガティブ染色法の理論と理想的な像	83
9-2	染 色 液	85
9-3	支 持 膜	86
9-4	支持膜の親水化	87

9-5 試料の調製	88
9-6 大きさの測定	89
文 献	90

細菌菌体成分分離調製法

10 細菌菌体成分分離調製法	川田十三夫, 水島昭二 93
10-1 グラム陽性菌の細胞壁	93
10-2 細胞質膜とメソソームの分画法	98
10-3 細菌の芽胞構成成分の分離精製—特にA型 ボツリヌス菌芽胞のエキソスポリウムの分画法	104
10-4 グラム陰性菌の細胞表層構造体調製上の問題点	107
10-5 ペプチドグリカン層	108
10-6 細胞質膜と外膜の分離	112
10-7 表層膜成分の精製	114
10-8 リボソーム	116
10-9 鞭 毛	119
10-10 線 毛	120
文 献	120

索 引	125
-----------	-----

編著者・著者紹介	129
----------------	-----

上 卷 目 次

走査電子顕微鏡法

- | | | |
|---|-----------|------------|
| 1 | 真菌学への応用 | 大隅正子 |
| 2 | 細菌学への応用 | 天児和暢 |
| 3 | ウイルス学への応用 | 新居志郎, 宇野文夫 |

凍結破断レプリカ法

- | | | |
|---|-----------|------|
| 4 | 凍結破断レプリカ法 | 天児和暢 |
|---|-----------|------|

凍結超薄切片法

- | | | |
|---|---------|------|
| 5 | 凍結超薄切片法 | 永山在明 |
|---|---------|------|

超 薄 切 片 法

6. 真菌学への応用

酵母は、古来、醸酵などの利用面と、真菌症などの有害面とを通じて人間と密接なかかわりをもつ生物である。近年では、微生物の中で最小限の細胞内小器官を有する真核生物として、癌をはじめ多くの問題に関する基礎研究の有用なモデル細胞の役割を果たしてきた。それは、高等動植物細胞と基本的には同様なオルガネラを含有しているという特性に加えて、①比較的小さく簡単な真核生物で、呼吸系が哺乳動物のそれに類似している、②世代時間が早く簡単に定まった培地で生育でき、細胞のいろいろな段階が得られる、③明確な核および細胞質の遺伝型を用いて交配したり、ミトコンドリアやマイクロボディ形成の条件がコントロールできるなどの利点を有するためである。したがって、酵母の生理学、生化学、遺伝学は非常な進展をみせてきた。近年、遺伝子操作の研究が始まると、この分野でも酵母は大腸菌について重要な実験材料として利用されてきている。

しかし、電子顕微鏡を用いての酵母細胞の超微形態の研究は最近まで困難をきわめた。それは、酵母がグルカン-マンナン¹⁾の厚い細胞壁を有するため、高等動植物やバクテリアで用いられる通常の四酸化オスミウム固定ができないうえに、エポキシ樹脂のような粘度の高い包埋剤が侵透しにくいことが原因であった。しかし、Zymolyase という細胞壁溶解酵素の登場により、現在ではどのような酵母でも、そしてどのような生育段階の細胞でも、この酵素によって細胞壁をとり除いて、プロトプラストやスフェロプラストを自由に得られるようになった。これにより、酵母の細胞分画や物質の単離が他の生物と同じように容易にできるようになり、酵母の機能面の研究にも一段と進歩をもたらした。また、電子顕微鏡観察のための試料作製も他の生物と同様にできるようになり、

超微形態の解析が急激に進展した。

酵母の超薄切片法といっても特殊な方法があるわけではなく、基本的には動物植物試料の場合と同じである。しかし、微小な試料というほかに、前述のように材料としてのいくらかの特殊性があるために、他の生物試料について行われた従来の方法を改変して行う必要があることが多い。そこで、この章ではなるべく他の章との重複をさせて、固定・包埋の根本問題は省き、酵母の超薄切片法についてのいくつかの基本的な方法と、材料の性質から生じる操作法に関して留意すべきことがらについて、筆者の経験に基づくいくつかの重要な問題点をあげたいと思う。

6-1 酵母の取扱い方

6-1-1 試料作製前の準備

電子顕微鏡による観察までには非常に長いプロセスを経る。まず、固定に始まって、脱水、包埋、超薄切片作製、電子染色、電子顕微鏡による写真撮影、そして最終的に写真仕上げといった数多くの段階があり、その中のどの一つが悪くてもよいデータを得ることはできない。筆者はこれを大きく3つに分けて考える。第一は固定から包埋まで、第二は切片作製と電子染色、第三は電子顕微鏡で観察し、そのイメージをフィルムにおさめ、さらに印画紙に再現する段階である。このうち、第二、第三の段階はやり直しができるが、第一の段階はある意味では全くやり直しができない場合さえあるし、やり直しには材料の準備から始まって、多くの時間もかかる。つまり、第1段階が一番大切な段階といえよう。中でも固定が重要で、固定はその後のすべてのプロセスにまで影響を与える。

しかし、固定と包埋が大事であるといっても、実際にはその前の段階、つまり試料の状態の吟味が大切である。特に、酵母を材料とする場合は、ただ形態学者が細胞の微細構造を研究するというだけでなく、生化学的裏づけをもった微細構造を研究したり、反対に機能的変化の構造的裏づけを研究したりすることが多いので、特にサンプリングという作業が大事である。したがって、サ