

研究裏話－硬組織・硬構造超薄切片及び ウラニウム染色のこと

渡部哲光*

歯牙骨組織や、貝殻そのほかの硬組織・硬構造を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察するためには試料の超薄切片を制作するのが普通である。そして試料が固いのでほとんど全ての場合、ダイヤモンド・ナイフを使用する。今の研究者はご存知ない方が多いと思うが、このナイフはフェルナンデス・モラン (Humberto Fernandez-Moran) 教授 (以後モラン教授と呼ぶ) が1950年代の終り頃発明した。教授は1924年ベネズエラのマラカイボ市 (首都カラカス市の西方にあり石油の大産地である) に生まれた。大学卒業後欧米に学び、後にカラカスの国立大学生物物理学科主任教授を1954年から1958年まで勤め、TEMによる神経解剖学の世界的権威として知られた。その間、矢張りカラカスにあるベネズエラ国立中央研究所にダイヤモンド・ナイフ工場を設立し、国内産出の原石を研磨して超薄切片用のナイフを作らせた。筆者はモラン教授から直接ダイヤモンド・ナイフの使い方を習い、そしておそらく世界で初めて軟体動物貝殻の超薄切片を作りTEM観察し、論文を発表した (Watabe, 1965)。以下にそのいきさつを紹介し、あわせて硬組織・硬構造薄片の染色について述べる。

1957年から1970年にかけて13年の間、筆者はノースカロライナ州ダーラム Durham市にあるデュークDuke大学動物学教室のウィルバー (Karl M. Wilbur) 教授の研究室に研究員としてバイオミネラライゼーションの研究をしていた。同教授はモラン教授とは大変親しくしていて57～58年頃カラカスを訪れた時、彼から刃渡り5mmを越える素晴らしいナイフを贈られた程であった。今日の価格では2～3mmのものが4000ドルはしているからこれは大変高価なナイフで、筆者もこれほどのものは以後見たことがない。ところでその直後にベネズエラで革命が起って大統領は追放され、大統領に近かったモラン教授も難を逃れてアメリカに移りボストンのマサチューセッツ工科大学 (MIT) に勤めた。ま

た、1966年には米国電子顕微鏡学会会長を務め、その年に京都市で第6回国際電子顕微鏡学会が開催されたので来日した。筆者はデューク大学滞在中、米国内・国外の研究所を訪れたが、1960年のはじめに矢張りボストンにあるハーヴァード大学医学部のマサチューセッツ総合病院 (Massachusetts General Hospital, 略してMGH) でグリムシャー教授 (Melvin A. Glimcher) のグループと共に研究をした。同病院は1815年の創立で、1800年代にエーテル全身麻酔によって外科手術を世界で初めて行ったという部屋が保存されてあった (しかし華岡青洲が1805年に乳癌の手術を全身麻酔によって行っているからMGHの手術は西欧で始めてとするべきである)。ともあれ早くから世界的な総合病院としての名声を博していたのは間違いない。グリムシャー教授はちょうど米国保健研究所 (NIH) から多額の研究費を交付されて整形外科研究室を新たに開設し、コラーゲンの石灰化機構の研究で当時の学会を風靡していた。病院の各研究室にはコラーゲン線維の構造を解析したシュミット (Francis O. Schmitt), ホッジ (Alan J. Hodge) などの錚々たる研究者がいた。今ではMGHはその医局員のほとんど全員がハーヴァード大学医学部職員であるが、当時はMITと兼任の研究員も多かったし、これら教授の下にいたポスト・ドックもMIT出身者が少なくなかった。

グリムシャーの研究室に着いてしばらくして気がついたのは、この病院の神経外科電子顕微鏡研究室の主任はMITと兼任でモラン教授が勤めていることで、驚きもし、また喜びもした。私の滞在したのは、1960年2月から3月にかけての最も寒い時期であった。ボストン大学のそばに数ブロックにわたり並んでいるヨーロッパ風の5階建赤煉瓦造りの古いアパートの一室を借りた。雪も多く、毎朝夕、チャールス河の川風に吹かれて通うのは、ノースカロライナの暖かい冬に慣れた私には随分寒かった。研究室ではカキ貝殻の有機基

* Norimitsu WATABE Department of Biological Sciences, The University of South Carolina, Columbia, SC 29208,

質の微細構造をテーマとした。しかし研究室は開設早々で、電子顕微鏡、X線回折装置など大型器械は発注はしたが未着だった。一応貝殻はEDTAで脱灰、樹脂包埋までは難なく出来たけれども、肝心のマイクロームも未だ設置されていなかったのもモラン研究室に行って仕事をする事となったのである。筆者がウィルバー教授の研究員であることから、彼は私を随分親切に扱ってくれた。目的の基質の構造は観察できたが、肝心のコラーゲンのような周期的な構造は見られなかった。実はそのこと自体に私は大して失望はしなかった。私は貝殻のカルサイトの結晶がどのように集合しているか、結晶軸はどのように配列しているかが知っていたのだ。それで、貝殻をそのまま切断してTEM観察が出来ないかどうか教授に相談した。ちょうどその頃には彼のダイヤモンド・ナイフ製造は軌道に乗っていたし、また、彼設計の超薄切片用マイクロームも1957年に完成（いずれもドイツのライツ(Leitz)社が取り扱っていた）としていて、これらの性能を示すのにも好機でもあった。

彼は、昼間はいろいろ雑用や邪魔が入って集中して仕事ができないから顕微鏡は夜使うことにしているという。指示にしたがって、昼間はグリムシャーの研究室に、そして夕食後7時ころからは電顕の研究室に通った。顕微鏡はイギリス以外のヨーロッパやアメリカで広く使われていたドイツのシーメンス(Siemens)社製のELMISKOPである。貝殻を砕いて1~2mmくらいの出来るだけ小さな破片を作り、これを一応オスミウムで固定、樹脂に包埋した。そのころはメタクリル樹脂がまだ全盛を極めていて(この樹脂は重合の際、細胞組織を破壊することがわかって1960年の終り頃から次第に姿を消していった)メチル・メタクリル:ブチル・メタクリル75:25(容量比)のものに包埋した。出来上がったブロックは普通のメチル25:ブチル75の割合のブロックに比べると格別に固く、トリミングするのも容易ではなかったが、このように資料に近い固さのブロックが適当であると教えられた(近年ほとんどの研究者が使用しているエポンepon系樹脂はそれほど固くないが、それでも差し支えないことが解ったのは大分後のことである)。

実は彼もこのような固い樹脂を作ったのはその時が初めてらしく、こんなに固いのは全く削りにくいとトリミングに苦労していた。切片制作は、彼のベネズエラ製ダイヤモンド・ナイフとマイクローム。後者は熱膨張式で手動であった。やはり手動式は“コツ”がいる。トリミングした試料が下がって来てナイフに当たり、0.6~1ミクロン位の薄片が切られてくるのだが、下がってくるスピードは遅からず、早からず、また一定でなければならない。運が良かったのか、それほど苦労

せずにカキ殻の内層切片が割に簡単に出来た。「なんだ、大した事ではないな」と思ったが、とにかくこれが炭酸カルシウム硬構造超薄切片制作の初めである。ただ注意されたのは、ダイヤモンドは周知のように硬度10で、あらゆる個体の中で一番固い。但しダイヤモンド・ナイフは脆いのでその刃を何かに当てると欠けるおそれがある。もう一つ、作業が終わったらすぐに、つま楊枝を折ってその先をアルコールでしめし、それでナイフの刃先に平行に刃先を軽く数回なぞって付着したプラスチックを除く。このクリーニングが重要である。これを怠ると切れ味がわるくなり、切片には所謂ナイフ・マークができたり、酷いときはちぎれたような切片ができる。そしてついには高価な‘研ぎ’(resharpening)に出さなければならなくなる。

グリムシャー研究室では10数人はいたMIT出身のボスト・ドック達、イギリスやスウェーデンからの研究員と一緒にコラーゲン線維の組織化学的観察の仕事もした。みんな非常に議論好きな連中で、まことに居心地が良かった。しかし、何といってもモラン教授に教示を受けたことは私にとって画期的なことであった。すなわち、MGHから帰って間もなく、デューク大学動物学教室は森を切り開いた新たなサイエンス・コンプレックスの一劃に建ったビルに移り、私は自分の設計したウィルバー電子顕微鏡研究室にNIHからの研究助成金でHitachi HU10Bを設置し、いよいよウィルバー教授と共同で本格的に硬組織・硬構造の超微細構造研究を始めたわけである。ちなみに、当時アメリカでは米国製のRCAと輸入品ではSiemensの顕微鏡が優勢で、Hitachi、Jeolの機器台数は北部のボストンやワシントン付近を除いてはほんの微々たるもので、南部では私達のものが最初であった。

さて、まず手掛けたのは、数種の二枚貝殻のアラゴナイト、カルサイト層の超薄切片による結晶の配列及び有機基質との構築構造関係の研究である。ナイフは最初はLeitz社より購入したモラン教授のベネズエラのナイフを用い、Porter-Blum 1(後にSorvallと改名)の手動のマイクロームを使用した。新たに採用した2人の助手もすぐに要領を覚えてきれいな貝殻の切片が出来た。有機基質と結晶との構築構造関係は、同一試料の連続切片中数枚を脱灰し、非脱灰切片と比較観察した。脱灰にははじめはEDTAを、また当時コラーゲン染色によく使われた燐タングステン酸が脱灰作用があることを発見し、これも使った。その当時は溶性基質の存在は未だ発見されておらず、脱灰により残ったものは不溶性の枠組基質、即ち貝殻の場合はコンキオリン[conchiolin-貝殻を溶かして残った有機物質(Frémy, 1855)]と考えられた。各平行層間の基質層、および個々の結晶を覆う一即ち結晶間の一基質膜の存

在は知られていたが、筆者は新たに、結晶内に入り込んでいる基質膜を発見し、各々にInterlamellar matrix (層間基質), Intercrystalline matrix (結晶間基質), Intracrystalline matrix (結晶内基質)と名付けた(結晶内基質には溶性基質も含まれていることがわかったのは約20年後である。しかし、論文には明記していないが、EDTA処理の場合は結晶内の基質が随分少ないことには気がついていた。その意義については後述する)。

ここでウラニウム染色つまり、酢酸ウラニウム(Uranyl acetate)水溶液による染色のことを述べたい。この物質は切片の有機質特にタンパク質との結合性が高く、且つウラニウムの原子量が高いから試料のコントラストを高め細胞構造が明瞭に観察出来る。また、有機基質も良く染まる。さらに、1980年頃に発見したことだが脱灰作用もある。それゆえ、貝殻やサンゴ骨格などの超薄切片を酢酸ウラン溶液に数10秒間浮かべて処理すると脱灰され、しかも有機基質が染まる。その上、溶性基質も‘固定’されて残るのである。このことはその抗体を作って免疫電子顕微鏡法で調べて証明した。グルタルアルデヒドで生体を固定する際に塩化セチルピリジニウム(Cetylpyridinium chloride)を固定液に加えておくと、この物質は酸性多糖類を固定するので、ウラニウム染色によってさらに多くの溶性基質が残る(Watabe *et al.*, 1993)。溶性の全てが‘固定’されるかどうかはわからない。しかし、

EDTAで薄片を脱灰するとウラニウム染色・脱灰より遥かに基質の量が少ないのは溶性基質がほとんど残らないためである。

ウラニウム染色が脱灰作用を持つことは案外知られていない。特に歯牙・骨組織などでは構成磷酸カルシウム結晶もこれに溶けるが、結晶粒が非常に小さいので、それに付随していて結晶の輪郭を保った基質だけが残っていても、低倍率では結晶との見分けが付きにくい。しかし電子線回析像をみればすぐに判明することである。

無脊椎動物、魚鱗や耳石、藻類の炭酸・磷酸カルシウムなどの結晶あるいはその非晶質多形の硬構造が私の研究室のテーマであるが、ウラニウム染色の脱灰及び溶性基質固定性の発見以来、試料は予め脱灰することなく切片を作り、結晶、不溶性、溶性有機基質間の相互超微細構造関係や、種々の基質構成要素の細胞内輸送経路などの透過電子顕微鏡研究が可能となったのである。

文 献

- Frémy, E. (1855) *Ann. Chim. Phys.*, 43, 93.
Watabe, N. (1965) *J. Ultrastr. Res.*, 12, 351-370.
Watabe, N., Kingsley, R. J. and Kawaguchi, T. (1993) In: *Structure, Formation and Evolution of Fossil Hard Tissues* (Kobayashi, I, Mutvei, H. & Sahni, A. eds.). Tokai University Press, Tokyo, 3-11.