

透過型電子顕微鏡試料の染色に用いる 酢酸ウランに代わる試薬の検討

岡本 貴樹（兵庫医科大学 共同利用研究施設）

OKAMOTO Takaki : Investigation of stains for electron microscopy as an alternative to uranyl acetate staining.

As uranyl acetate is an Internationally Controlled Substance, a control report must be submitted to the Nuclear Regulatory Authority twice a year. To simplify the reporting process by reducing the amount of uranyl acetate used, an alternative staining method was investigated. Mouse kidney and apoferritin were stained with each reagent and captured transmission electron microscopy images. These images indicated that 'EM-stainer' or gadolinium acetate could be substituted for uranyl acetate.

1. 目的

電子顕微鏡試料の染色に用いられる酢酸ウランは、国際規制物資に指定されているため、年に2回、原子力規制庁に管理報告書を提出する必要がある。この報告業務の効率化のために、酢酸ウランの代用染色液の検討を行った。

2. 試薬・方法

—試薬—

使用した染色試薬は次の通り。①：酢酸ウラン ②：酢酸ガドリニウム ③：塩化サマリウム ④：リンタングステン酸 ⑤：リンモリブデン酸 ⑥：EM ステイナー（日新 EM）

なお、本報告で示す画像には、上記番号に対応するように表記した。

—方法—

樹脂包埋されたマウス腎臓を70 nm厚に薄切し、2% (w/v) 染色液（メタノール）で20分間染色した。水洗後、5分間の鉛染色を行った。

0.1 mg/mL アポフェリチンを調製し、グリッドに吸着させた。水洗後、1% (w/v) 染色液（超純水）で数秒間だけ染色した。

透過型電子顕微鏡 JEM-1400Plus (80 kV) で、マウス腎臓 (x5,000) とアポフェリチン (x100,000) の観察・撮影を行った。

撮影した画像の評価を、電子顕微鏡利用者6名に対して依頼した。アンケートは Google フォームで作成し、画像は使用した染色液を伏せた状態で提示した。なお、画像の評価にはマウス腎臓のみを使用した。

3. 結果

撮影したマウス腎臓 (図1) とアポフェリチン (図2) の画像を示した。染色性に差はあるが、いずれの試薬を用いた場合でも組織・タンパク質両方の染色が可能であることがわかった。また、④リンタングステン酸および⑤リンモリブデン酸で染色したものは、どちらも輪郭がぼやけた像しか得られなかった。その一方で、②酢酸ガドリニウム、③塩化サマリウム、⑥EM ステイナーは良好な染色性を示した。興味深いことに、③塩化サマリウムはマウス腎臓に対しては良い染色性を示したが、アポフェリチンに対しては、凝集を引き起こしており観察に適していないことが判明した。

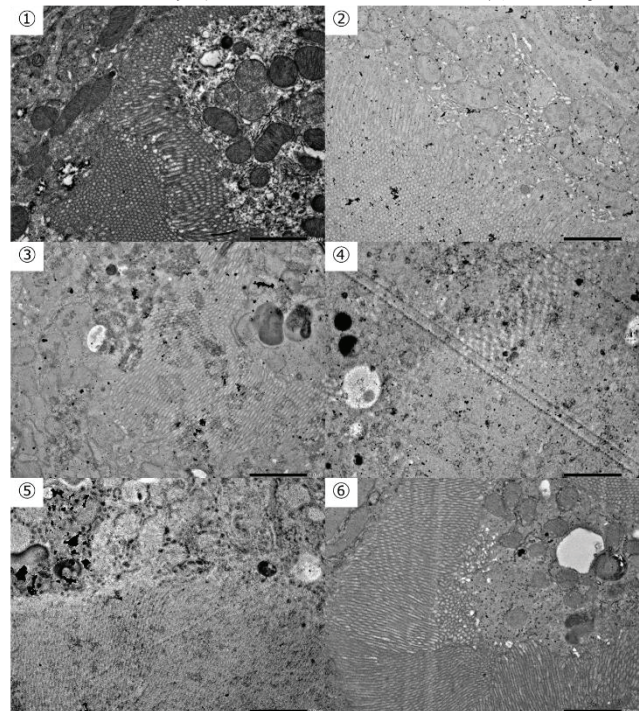


図1. マウス腎臓 撮影画像 (5,000倍)

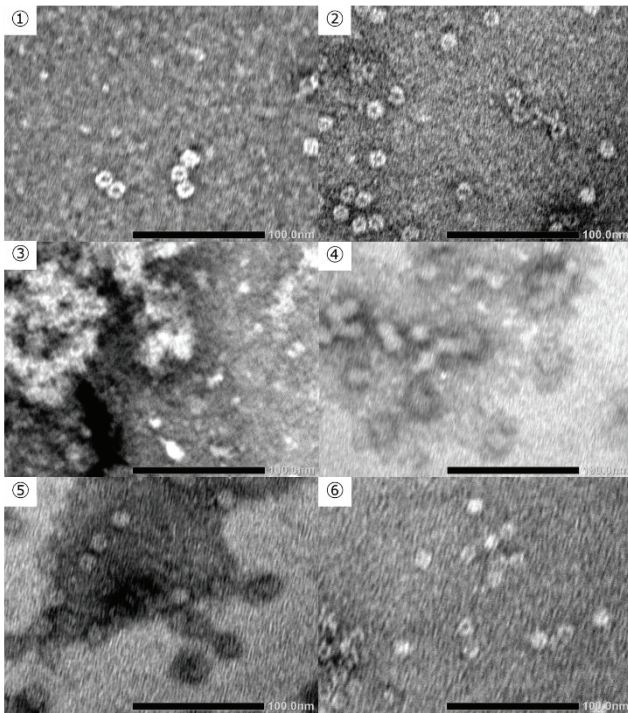


図 2. アポフェリチン 撮影画像 (100,000 倍)

施設に設置している透過型電子顕微鏡 JEM-1400Plus の利用者 6 名を対象に簡易的なアンケートを行った。質問内容は以下の通り。

1. 微細構造の観察に「支障がない」、「最適」と思う画像
2. 距離の計測に「支障がない」、「最適」と思う画像
3. 自分の実験に「使える」、「使えない」と思う画像

アンケートの集計結果を図 3 に示した。「支障がないもの」として、微細構造の観察と距離の計測のどちらの項目についても、①酢酸ウラン、②酢酸ガドリニウム、⑤リンモリブデン酸、⑥EM ステイナーが多く選ばれていた。それに対して、④リンタングステン酸は全く選ばれていなかった。「最適なもの」を選択する項目では酢酸ウランが一番選ばれていた。

自分の実験に使えるかどうかの質問に対して、①酢酸ウラン、⑥EM ステイナーが「使える」で同票であった。一方で、「使えない」においては、④リンタングステン酸が一番選ばれていた。

4. まとめ

今回、電子顕微鏡試料の染色液の検討として、5 種類の試薬を用い、マウス腎臓とアポフェリチンの染色から撮影までを行った。また、撮影した画像を、電子顕微鏡利用者に見てもらうことで、客観的に染色液の評価を行うことができた。今回の検討では酢酸ウラン

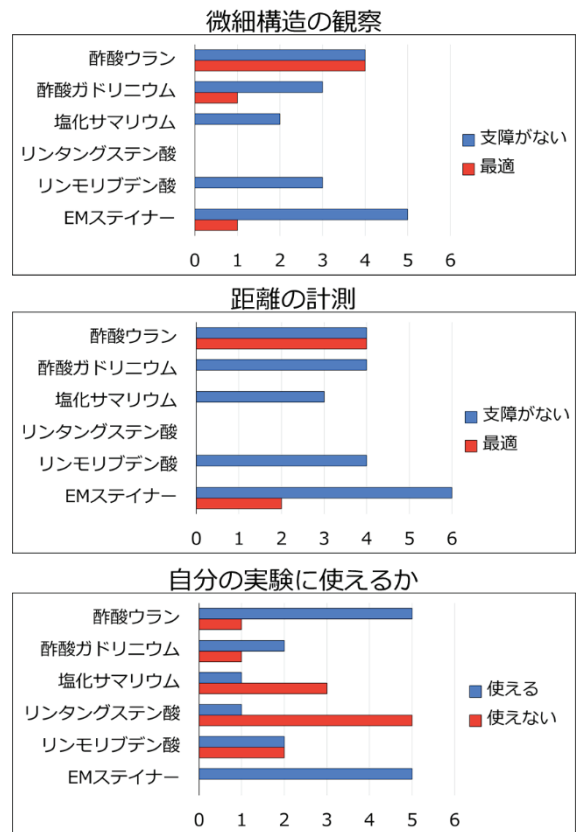


図 3. 利用者アンケート集計結果

の代用試薬として、多く取り上げられている試薬を中心に選択した。中でもリンタングステン酸は、多くの利用実績があるため高い染色性を期待していたが、実際に使用してみると、電子顕微鏡利用者から一番低い評価を受けていた。今回は染色液の濃度や時間などの詳細な条件を検討していないため、これらの条件を最適化することで改善できると考えられる。

興味深いことに、塩化サマリウムを染色液として用いた際、マウス腎臓では良好な染色性を示し観察できたが、アポフェリチンでは凝集が起り観察できない状態になっていた。この結果から、使用する染色液によっては観察対象が正しい構造を保てていない場合があることを、改めて認識することができた。

また、今回撮影した画像と利用者アンケートの結果から、酢酸ウランの代用として EM ステイナーが利用できる可能性を示すことができた。今後は染色時間や濃度などを調整し、より酢酸ウランに近い染色性を示す条件を探索する予定である。

謝辞

本報告において、マウス腎臓の樹脂ブロックを提供していただいた藤本律子研究生に深く感謝いたします。