

## 陽性荷電鉄コロイドを用いた 走査電顕用微小生物試料の載台

岡山大学医学部第二解剖学教室 (指導: 村上宅郎教授)

大河内秀記

(平成3年11月26日受稿)

**Key words:** 走査電子顕微鏡, 微小試料の載台, 陽性荷電鉄コロイド

### 緒言

塩化第二鉄, 抱水ヒドラジンとカコジル酸で調製した陽性荷電鉄コロイドは非常に安定で微細な粒子(1.0nm)から成り, 組織や細胞の陰性イオン基の詳細な光顕ならびに電顕的検索を可能にした<sup>1,2)</sup>, 私達の最近の血球を用いた実験によると, この陽性荷電鉄コロイドは, 走査電子顕微鏡観察のための非常に小さい生物試料のガラス片への載台に用いることができ, その作用は現在一般に使用されているポリ-L-リジン<sup>3-5)</sup>より強力であることが判明している. 本稿はこの陽性荷電鉄コロイド載台法の詳細を述べる.

### 材料と方法

陽性荷電鉄コロイドを, 以下のごとく, 村上の方法<sup>1,2)</sup>で調製した. すなわち, 0.1Mカコジル酸水溶液に, pHが7.2~7.4になるまで, 抱水ヒドラジンを滴下する. この抱水ヒドラジン・カコジル酸水溶液10容に0.1M塩化第二鉄水溶液1容を混じる. そして, この抱水ヒドラジン・カコジル酸・塩化第二鉄混液を, その色が黄色から暗赤褐色になるまで, 2~3分間煮沸し, その後室温にまで放置冷却する. このようにして得られた微粒子陽性荷電鉄コロイド原液を, 使用直前に上記抱水ヒドラジン・カコジル酸水溶液(pH7.2~7.4)で3倍に希釈し, さらに1~10N塩酸と抱水ヒドラジンを用いてpH7.2~7.4に調整する.

52歳日本人男性の耳介より2~3滴の血液を採取し, リンゲル液中に拡散後(1.000~2.000/

mm<sup>3</sup>)約5分間振盪して洗浄したのち, 遠沈して(5.000rpm, 約10分)血球を分離した. この分離血球を0.1M 磷酸緩衝液1.0%グルタールアルデヒド液(pH7.2~7.4)に拡散して(1.000~2.000/mm<sup>3</sup>)約30分間振盪して十分固定し, その後上記の如く遠沈して血球を分離し, さらに0.1M 磷酸緩衝液(pH7.2~7.4)中に拡散した(1.000~2.000/mm<sup>3</sup>). 別の試料として, 採血後約10日間4℃で保存した血液を上記新鮮血と同様に処理してグルタールアルデヒド固定し, 同0.1M 磷酸緩衝液(pH7.2~7.4)中に拡散した(1.000~2.000/mm<sup>3</sup>).

光顕用カバーガラスを適当な大きさに切り(4×5mm位), 100%アルコール, 100アセトン, 蒸留水に浸して洗浄し, 濾紙上で空気乾燥した. このガラス片を上記調整したpH7.2~7.4の希釈陽性荷電鉄コロイド液中に10分間浸し, 0.1M 磷酸緩衝液(pH7.2~7.4)中でよく洗った後, 上記固定新鮮血液拡散シャーレと固定保存血液拡散シャーレの中にそれぞれ静かに沈めて約10分間静置し, ガラス片上に血球を沈澱させた. その後, 各ガラス片をそれぞれのシャーレ中より取り出し, 蒸留水中に浸して軽く洗い, 余分の沈澱血球を除去した.

上記のごとく処理して血球を載台したカバーガラス片を上昇アルコール系列(30, 50, 70, 80, 90, 95, 100%)を通し, 直ちに液体炭酸ガスを媒体として臨界点乾燥し, 金を軽く真空蒸着して, 加速電圧25kV 下に走査電子顕微鏡(HHS-2R, 日立)観察した.

対象実験として, Mazia<sup>5)</sup>や Tsutsui et al.<sup>6)</sup>

あるいは宇野他<sup>7)</sup>に従って、カバーガラス片を0.1%ポリ-L-リジン(分子量70,000~85,000)で処理し、それぞれに上記の方法に準じて固定新鮮血球と固定保存血球を載台した。これらの対象実験試料も、上記のごとく、脱水金蒸着の後、走査電子顕微鏡で観察した。

陽性荷電鉄コロイド処理ガラス片とポリ-L-リジン処理ガラス片への血球の載台は同一シャーレ内で同時に行った。

### 結果と考察

新鮮な状態でグルタルアルデヒド固定した赤血球は陽性荷電鉄コロイド処理したカバーガラス片(カバースリップ)上に比較的密に観察され

た(図1)。一方、同赤血球はポリ-L-リジン処理したカバースリップ上には比較的疎に載台されていた(図2)。前者と後者に於ける赤血球の一定面積内の数の比は平均して6:1であった(図1, 2)。両者において、白血球や血小板の載台も確認できた(図1, 2)。また赤血球で検索した限りでは、血球の表面に鉄コロイド処理或いはポリ-L-リジン処理によると思われるような汚染は認められなかった(図3)

陽性荷電鉄コロイド処理したカバースリップはグルタルアルデヒド固定した保存赤血球もよく載台していた(図4)。一定面積内の同赤血球の載台数は新鮮固定赤血球のそれ(図1)に匹敵していた。一方、ポリ-L-リジン処理した

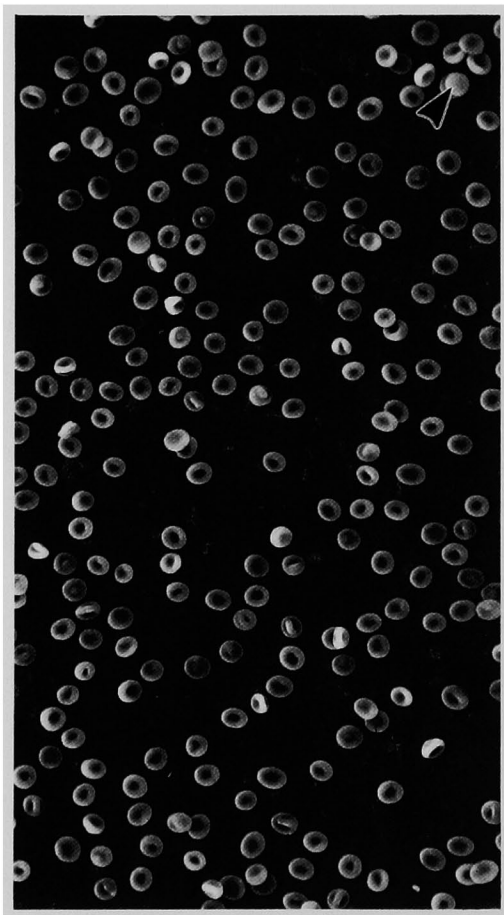


図1 陽性荷電鉄コロイドを媒体としてガラス片上に載台したグルタルアルデヒド固定ヒト新鮮赤血球群の走査電顕像。矢頭印は白血球を示す。×600。

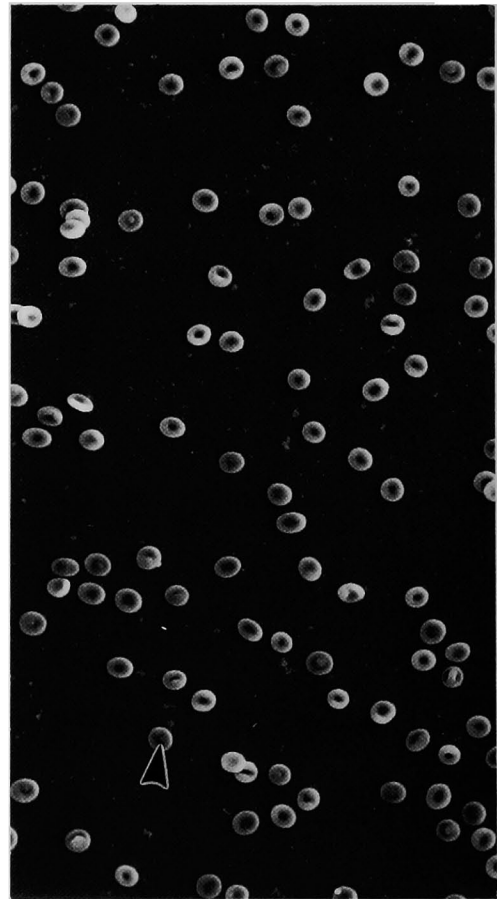


図2 ポリ-L-リジンを媒体としてガラス片上に載台したグルタルアルデヒド固定ヒト新鮮赤血球群の走査電顕像。矢頭印は白血球を示す。×600。

カバースリップには同固定保存血球は、赤血球や白血球を含めて、ほとんど載台されなかった。

一般に血球、細菌はじめ浮遊系細胞あるいは微小生物系試料を走査電子顕微鏡観察する際に、試料をあらかじめ適当な下地に付着させておくと、脱水などのとき煩雑な遠沈操作等が省略でき、また一度に多数の試料（個々の細胞ないし微生物）を観察できて便利である。このために、Mazia<sup>3)</sup>以来、カバースリップの表面をポリカチオンであるポリ-L-リジンでコートし、この上に試料を載台する方法が一般的に採用されてきている<sup>4,5)</sup>。

本稿は上記調製した陽性荷電鉄コロイドも、ポリ-L-リジンと同様に、微小生物系試料をカバースリップに接着させる効果をもつことを明確にすると共に、この接着力は現在一般に使用されている高価なポリ-L-リジン<sup>3-5)</sup>よりも一層強力であることを示している。陽性荷電鉄コロイド処理したカバースリップに多数の固定保存赤血球が載台されるのに対して、ポリ-L-リジン処理したスリップには同赤血球が載台されにくい点が、このことを明瞭に証明している。

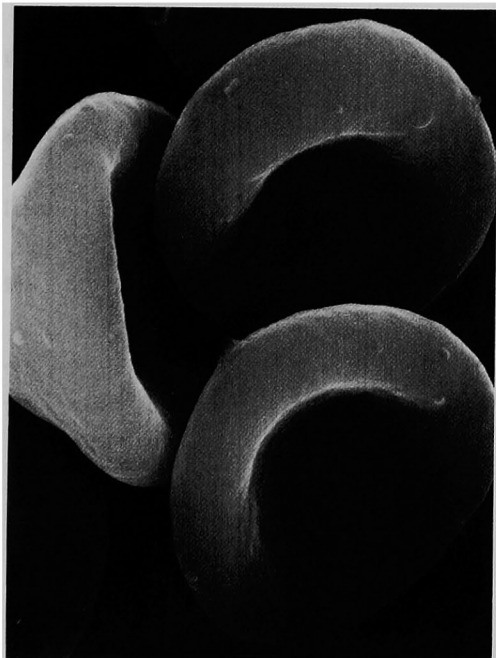


図3 図1の一部拡大像。×7,900.

本稿で紹介した陽性荷電鉄コロイドは、ポリ-L-リジンと同様に、ポリカチオンであり、電子顕微鏡で観察すると1.0nm前後の粒子からなる<sup>1,2)</sup>。この粒状性ポリカチオンの特徴が効果的に接着作用を発揮し、ポリ-L-リジンが反応しにくい程に表面の陰性荷電基の減弱した固定保存（老化）赤血球とも反応し得、同赤血球をスリップ表面に接着し得たと考えられる。なお、抱水ヒドラジンの代りにアンモニアを使っても陽性荷電鉄コロイドを作ることができ<sup>6)</sup>、微小生物試料の載台に使うことができる。ただし、このコロイドは粒子（3～4 nm）が大きく、また陽性荷電鉄の力価が抱水ヒドラジンによって作られたものより劣るので<sup>1,2)</sup>、試料の載台効果は劣る。

一般に、新鮮赤血球を含めて、いわゆる生きた（未固定）細胞あるいは微小生物の表面はプロテオグリカンなどによって負に帯電している。従って、本稿で紹介した陽性荷電鉄コロイド法はこれらの未固定微小試料の載台にも十分使用できる。事実、村上宅郎教授との実験では、未固定赤血球は固定赤血球より一層密に、陽性荷電鉄コロイドを媒体（接着剤）として、カバー

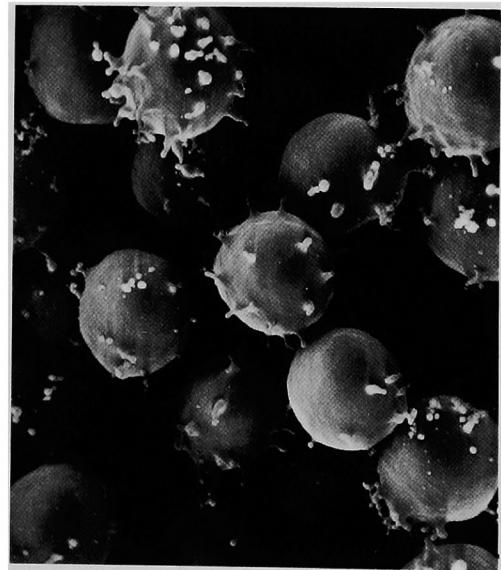


図4 陽性荷電鉄コロイドを媒体としてガラス片上に載台したグルタルアルデヒド固定ヒト保存赤血球群。×4,500.

スリップ上に載台される。しかしこの場合、生きた細胞は（赤血球を含めて）スリップに接着するために変形する。

ここで、もう一つの村上宅郎教授との実験を記すると、1%L-リジンあるいはL-アルギニン（塩基性アミノ酸）による単独処理でも、生きた（新鮮未固定）赤血球はカバースリップ上に密に接着する。この塩基性アミノ酸による接着効果はポリ-L-リジンに劣らない。中性アミノ酸でもある程度の接着効果を発揮するが、その効果は赤血球で調べたところ、塩基性アミノ酸の1/3分程度である。

本稿で紹介した陽性荷電鉄コロイドはpH1.0~8.0の範囲で安定である<sup>1,2)</sup>。pHを変えて載台を試みるのも、載台すべき細胞または微小生物試料の表面荷電状態が検討できると共に、特定の或いは、ある種の細胞の撰択的載台を可能にするものである。

## 結 論

塩化第二鉄、抱水ヒドラジンとカコシル酸で調製した陽性荷電鉄コロイドは、赤血球など微小生物試料のカバーガラス片などへの載台の際、ポリ-L-リジンをしのご強力な接着剤である。この鉄コロイドはグルタルアルデヒド固定赤血球も十分カバーガラスに載台し、これらの試料の走査電子顕微鏡観察を容易にする。未固定新鮮赤血球の同ガラス片への載台には塩基性アミノ酸（L-アルギニンやL-リジン）単味処理で十分である。

稿を終るにあたり、ご指導いただくと同時に実験を共にしていただいた村上宅郎教授に感謝致します。文献をご教示いただいた吉田まり子博士（本学ウイルス学教室）にもお礼を申し上げます。

## 文 献

- 1) Murakami T, Taguchi T, Ohtsuka A, Sano K, Kaneshige T, Owen RL and Jones AL: A modified method of fine-granular cationic iron colloid preparation: its use in light and electron microscopic detection of anionic sites in the rat kidney glomerulus and certain other tissues. *Arch Histol Jpn* (1986) **49**, 13-23.
- 2) 大塚愛二, 宇野芳史, 田口勇仁, 村上宅郎: 陽性および陰性荷電鉄コロイドによる組織・細胞荷電基の光顕ならびに電顕的検出. *岡山医誌* (1991) **103**, 11-18.
- 3) Mazia Z, Schatten G and Sale W: Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol* (1975) **66**, 198-200.
- 4) Tsutsui K, Kumon H, Ishikawa H and Tawara J: Preparative method for suspended biological materials for SEM by using of polycationic substance layer. *J Electron Microsc* (1976) **25**, 163-168.
- 5) 宇野文夫, 吉田まり子, 山田雅夫, 赤塚和也, 新居志郎: ウィルス学領域における走査電子顕微鏡法. *細胞* (1989) **21**, 144-149.
- 6) Seno S, Akita M, Ono T and Tsuji T: Fine-granular cationic iron colloid. Its preparation, physiological characteristics and histochemical use for the detection of ionized anionic groups. *Histochemistry* (1985) **82**, 307-312.

**Cationic iron colloid as a mounting mediator of biological  
microsamples for scanning electron microscopy**

**Hideki OUKOUCHI**

**Human Morphology Section, Department of Anatomy,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. T. Murakami)**

**Ferric chloride, when boiled with hydrazine hydrate and cacodylic acid, is converted into a fine cationic iron colloid. This colloid allowed good adhesion of biological micro-samples, including the fixed ones, to the glass slips and facilitated the scanning electron microscopy of these samples. The colloid was much more powerful in this mounting than the usually used and expensive poly-L-lysine. Living cells, such as human red blood cells, are easily and sufficiently mounted with L-lysine or L-arginine on the glass slips.**