

ミクروسコピア

vol. 16 no. 4

microscopia

虫の装いと衣替えの細胞生物学

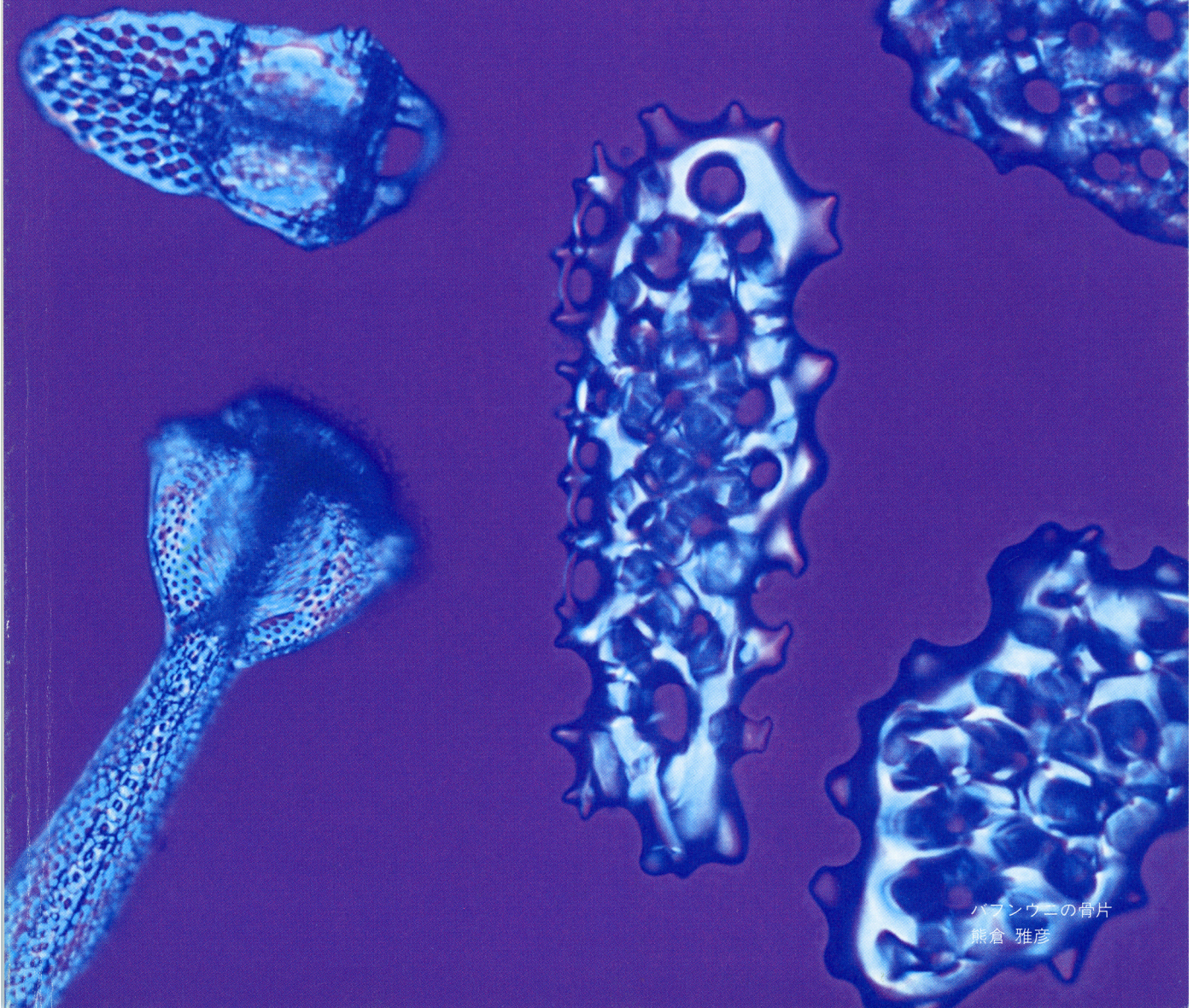
藤原 晴彦

夢の切片—まるごと2ミクロン

川本 忠文

巡礼の路に病院の歴史を訪ねて

木村 明



ハブウエの骨片
熊倉 雅彦

<夢の切片>

固定も脱灰もせず2ミクロンで切る

川本 忠文



大学そばの総持寺勅使門前で

硬い骨や歯をふくむ組織や、実験動物の全身を、まるごと2ミクロンの切片に切れないだろうか。固定も脱灰もせずに、カルシウムや酵素など、水に溶ける物質もそのままの状態凍結して。そんな夢が18年の模索の末に実現し、「驚異の切片」としていま学界に衝撃を与えている。(編集部)

骨や歯を研究する者は、いつも「脱灰」という問題に悩まされる。脱灰(骨からカルシウムなどのミネラルを溶かし出すこと)をしなければ、厚さ数ミクロン(μm : 1 mmの千分の1)の切片を切ることが出来ず、その脱灰の「前ごしらえ」として、組織をホルマリンなどで化学固定しなければならない。これらの過程で、生体成分が溶出したり、蛋白が変性するなどして、組織から多くの情報が失われる。固定や脱灰処理なしに薄い切片を作ることが出来たならば、蛋白の変性がなく、酵素活性が完全に保たれ、しかも水溶性の物質なども全て保存された理想的な切片が得られ、骨や歯を研究する者ばかりでなく、生命科学の多くの研究者に新しい世界を開いてくれることになるだろう。またこのような技術によって、実験動物の全身から数ミクロンの切片を作ることが出来れば、顕微鏡の下に全身の物質分布を検索することが可能となる。題名の「夢の切片」とは、そのような切片のことである。

良き理解者との出会い

この「夢の切片作製」の話は、清水正春先生(鶴見大学 前歯学部部長, 生化学教授, 1998年9月没)との出会い抜きには語れない。私が19歳の時、学費と生活費を得るために鶴見大学を訪ねた時に始まった先生との付き合いは、先生が昨年急逝されるまで続いた。清水先生は、硬組織の石灰化について

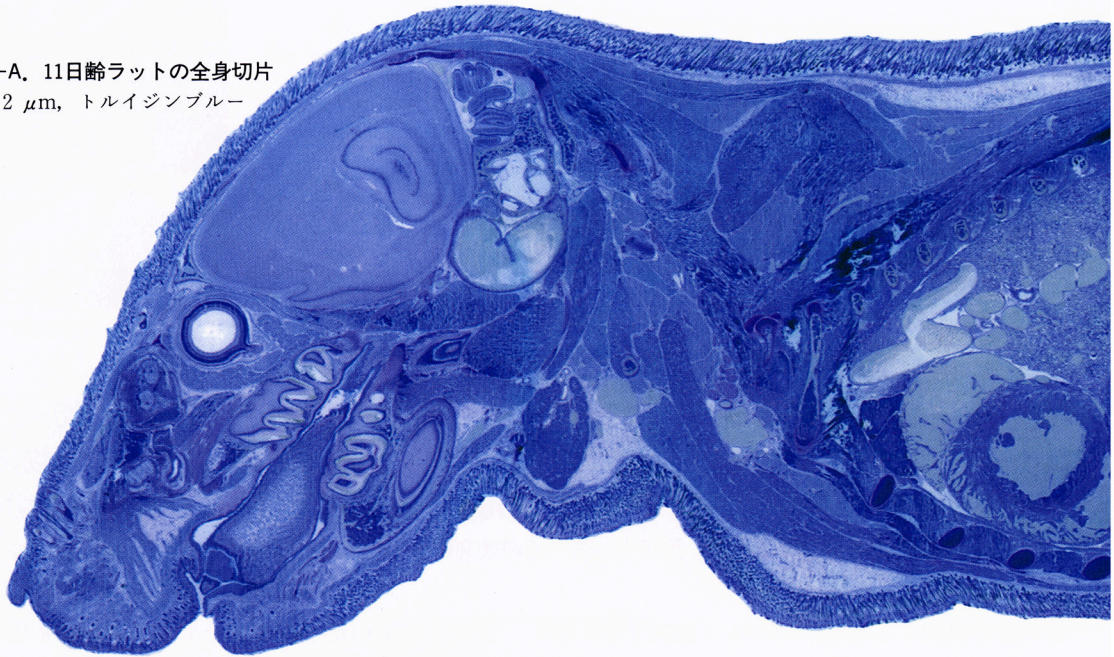
研究されていた生化学者でありながら、形態学にも強い関心を抱いておられ、卒業のときに生物学の分野で仕事をするなどとは思ってもいなかった私に、「そのまま残らないか」と言われた。先生とは妙に気が合っていたので、思いきって清水先生のもとで働きながら勉強することにした。清水先生は、どんなに忙しい時にでも気軽に質問や相談に応じてくださり、自分の考えを押しつけることなく、納得いくまで自由に研究させてくださる先生で、私のように「凝り性」の人間にとって本当に有難い存在であった。

先生から「第一種放射線取扱主任者の資格を取れ」と言われた時、放射線の物理的なことしか知らない私には大変な課題だったが、運良く合格した。その時、お祝いに先生が大切にしていた高価な洋酒をプレゼントしてくださり、本当に喜んでくださっているのがわかった。それから3年後に先生の念願だった放射性同位元素ばかりでなく、生物組織の機能や形態などを総合的に研究できるRI研究センターが完成し、先生の意図がわかり、先生との二人三脚の研究が始まった。

「夢の切片」を求めて

組織を切片にするには二つの道がある。組織を処理(固定や脱灰など)してから切片を作る方法と、切片を作ってから処理する方法である。骨や歯の形成過程について研究するには、固定や脱灰の処

図1-A. 11日齢ラットの全身切片
厚さ2 μm , トルイジンブルー
染色



理のしていない切片が必要で、さらに骨や歯へのカルシウム輸送について研究するには、水溶性物質が溶けずに残っている切片が必要である。

私たちは、こうした色々な研究目的に利用できる切片があれば…と考えていた。つまり、1枚目は組織学、2枚目は酵素組織化学、3枚目は免疫組織化学（免疫反応を利用して特定物質の局在を調べる方法）、4枚目は遺伝子組織化学（*in situ* hybridization：組織のどこに、どのような遺伝子が発現しているかを調べる方法）、5枚目は光顕オートラジオグラフィ（放射性同位元素で標識された化合物を用いて代謝経路を調べる方法）、6枚目は元素分析、7枚目は赤外顕微鏡観察、8枚目は微小領域の生化学的分析等への利用。

それには未固定で、しかも非脱灰の切片を作るという選択肢しかなかった。しかし、従来の技術では、骨や歯のような硬い組織を含む試料を、固定も脱灰もせず数ミクロンの凍結切片にすることは不可能だった。そこでまず切片を作る新しい方法を開発しようということになった。

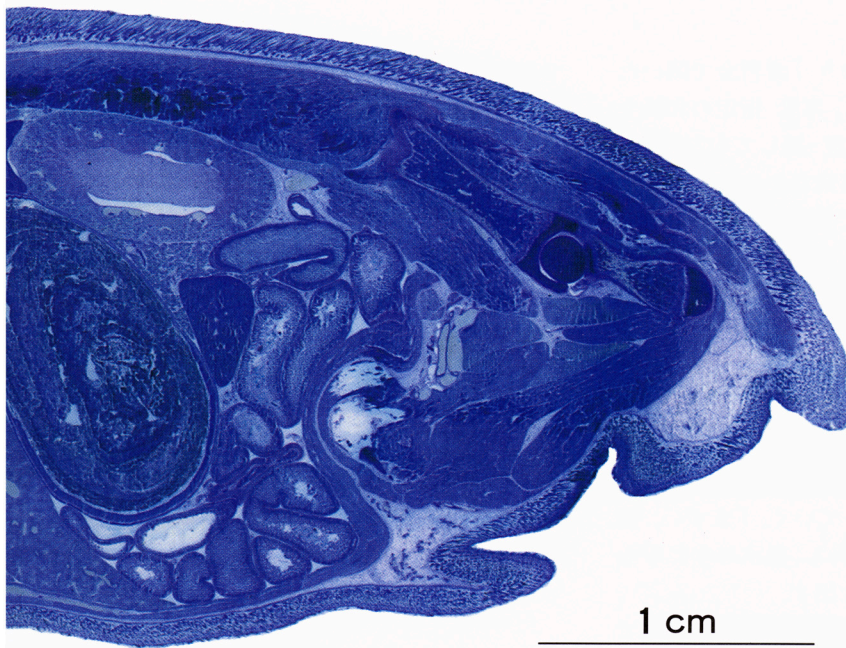
RI研究センターには、全身オートラジオグラフィ用の全身凍結切片作製装置（凍結したラットを丸ごと切れる）があり、それを納めた業者は「どんな物でも切れますよ」と説明していた。素人の私たちは大喜びで骨と歯を含んだ試料を切ってみた

が、知識と経験の不足もあって、切片と言えるものは作れなかった。

そんな時、某会社主催のオートラジオグラフィの講習会があり、専門外の私たち二人も参加した。その時、未固定で非脱灰の試料を凍結し、この試料の表面に湿らせた和紙を凍着させてから切ると、広い面積の凍結切片でも和紙に貼り付いた状態で採れるという話があった。「私たちが探し求めている切片はこれだ」と思い、帰ってすぐに試したが、聞いた話のようにはいかなかった。この時（1981年）から「夢の切片」を求める旅が始まった。

ナイフがなければ組織は、ただの肉塊

全身凍結切片作製装置では、骨を含んだ試料から簡単に切片を作ることが出来るが、その切片は全身オートラジオグラフィには使えても、さまざまな目的の顕微鏡観察用としては厚すぎるので、まず試料を薄く切ることに着手した。指導書ののっとり凍結試料を凍結包埋し、骨も切れる特殊ステンレス鋼製の新品のナイフで切ってみた。すると試料は厚さ5 μm で簡単に切れ、「思ったよりも簡単！」と喜んだ。ところが続けて切っていると、だんだんと切れ味が落ち、10 μm で切るのがやっと。「おかしい、このナイフは何枚でも切れ



巻いてしまったり、小さくちぎれてしまったりして、切片として使用することができない。その「削りかす」を「切片」に変えるにはどうすればよいか。まずは、「原著に従って粘着テープに取ってみよう」と粘着テープを試料の表面に貼り付けて切ると、「削りかす」がテープに支えられて「切片」になっている。「これで解決だ!」と喜んだのもつかの間、切片を染めてみると、まずい! 染色中に切片がテープから離れて壊れていく。この方法が普及しな

るとの説明だったのに」と思いながら実態顕微鏡で刃先を見るとシャープさがなくなり、一部が欠けている。「新しいナイフを」と思っても10万円以上(言いづらい)、国内で研磨できないために研磨に出しても数ヶ月(待てない)。

どうしようかと悩んでいる時、学内にパラフィン切片用ナイフの研磨装置を見つけ、「自分で研磨すれば解決だ」と借用してナイフを取り付けたものの、ナイフの形状が違いすぎて研磨できないことがわかった。しかし、ナイフの問題解決には、その研磨装置の利用以外に考えられず、しばらく思考錯誤を重ねた結果、アタッチメントを作ることによって解決できることがわかり、すぐに試作して研磨を試した。ところがナイフが硬いためか、なかなかナイフの刃先がシャープにならず、ただ砥石が磨り減っていくばかりだった。やはり自力での研磨は無理かとあきらめかけていた時に、骨や歯を研磨する時に使う研磨紙がこの装置の砥石の代りになるのでは…と思い、砥石の上に両面テープで接着して試したところ、これが大成功で、ナイフに関する問題は解決した。

利用できない切片は、ただの「削りかす」

ナイフで薄く切られた凍結組織は、木に鉋をかけて出る「削りかす」のようなもので、クルクル

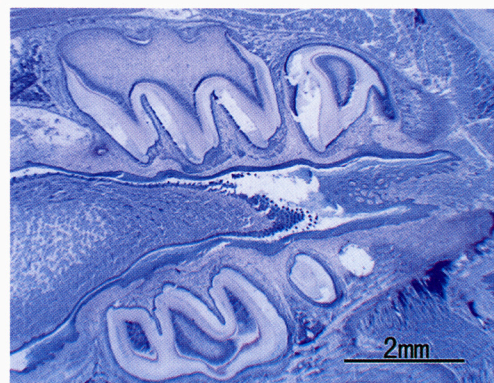


図1-B. 口腔領域の拡大像 白歯と舌が見える。

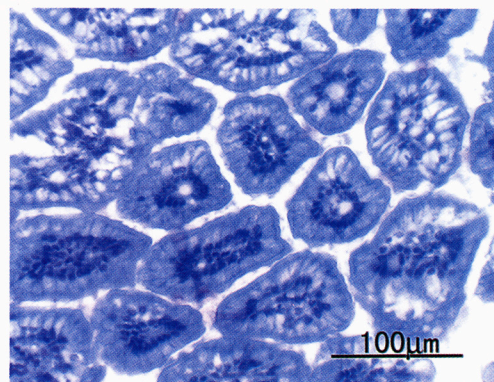


図1-C. 腹部から腸絨毛を拡大して見る。

かった理由がわかった。やはり「講習会で聞いた和紙を使う方法しかない」と、再度 指定の和紙を用いて薄切に挑戦するが、何度 試しても、完全に伸展した切片を得ることが出来なかった。

その頃は、真冬だったので実験室の環境は最悪状態だった。昼間はボイラー室から蒸気が送られて暖かいが、湿度は10%程度で体は常に静電気を帯びた状態、蛇口に近づくと体から火花。夜は暖房が切れ、冷たい外気の吹きさらし(放射性同位元素を使用する実験室は、常時 換気されている)。そんな実験室で 時間も忘れて -20℃ の冷凍庫内で手作業を続けていると、指がだんだんと動かなくなり、次いで感覚もなくなっていく。「まずい、凍傷だ！」 急いでゴム手袋を外し、温水の中に手を入れ10分ほどすると指が動き出す。

こんな苦勞の甲斐もなく、和紙を用いる方法では、和紙を試料の全表面に凍着することが難しく、逆に和紙の性質が欠点となって、良好な切片が得られなかった。思いきって、和紙よりも薄く 緻密で 伸縮性の少ないコピー用紙を、湿らせないで用いることにした。その紙を薄切面の試料の観察すべき部位にのみ置き、その上から薄切面の全面に粘着テープを貼り付けて薄切する方法に切りかえた。しばらくやってみると、時どき切片が取れるようになった。ナイフの形状と角度、薄切スピード、薄切中の切片押さえなどを微妙に変えながら薄切を繰り返していると、数ヶ月後に9日齢ラットの全身(約4 cm×10cm)から切片が作れるようになった。この結果、未固定非脱灰の試料から水溶性物質など全ての情報を含んだ切片を作るという「夢」が現実のものになった(1984年)。

ひとつと多い

早速 この切片作製法を外国の専門誌に発表しようとして投稿したが、現実には甘くなかった。一人の審査員からクレームがついて却下された。「組織学の標本としては問題ないが、切片をスライドグラスに接着するために用いた卵白グリセリンは、水溶性物質の移動を引き起こす恐れがあり、水溶性物質のオートラジオグラフィーに利用するには問題がある」との理由だった。論文の最後に、一言「水溶性物質のオートラジオグラフィーにも利用

できる」と書いたのが まずかったのだ。

こうなったら反論の余地のない切片を作り実証するしかない。「組織学的研究、組織化学的研究、水溶性物質のオートラジオグラフィー等が光顕レベルで行える全身切片の作製法」という大目標を掲げ、再挑戦することにした。その時、清水先生が「おしっこを切片にして水溶性物質のオートラジオグラフィーに利用できることを証明すれば」とお酒を飲みながら気楽に一言。「その一言が大変なのだ！」とは思っても、この方法の確立のためには、「おしっこ」を切片にしてみせるしかない。最終的に実験動物に放射性カルシウムを投与し、膀胱内の尿中における放射性カルシウムの分布を示すことになった。

町の研究者

問題となった卵白グリセリンに代わる接着剤を探さなくては、と町に出て、文房具店、雑貨屋、建築材料店等を回って接着剤と名のつく物は、片っ端から買い集めて試した。その中に紙を貼り付ける時に使用する「粘着のり」という製品があり、これは透明で強い粘着力をもっていた。この接着剤をスライドグラスに塗布することで、コピー用紙上の切片をスライドグラスに簡単に移すことが出来るようになった。

次に、この切片が水溶性物質の光顕オートラジオグラフィーに利用できることを証明することになった。通常の光顕オートラジオグラフィーで用いられている乳剤膜(標識化合物から出てくる放射線を検出するために用いるゼラチンと臭化銀で出来た膜)を切片に密着する方法では、乳剤膜が厚いために湿らせなければ、乾燥した切片に密着することが難しく、この密着過程で水溶性の標識化合物が移動して、正確な情報が得られなくなる。この移動を避けるために、薄い乳剤膜を作る方法と、乳剤膜を切片に密着する方法を開発しなければならなかった。

乳剤膜開発のヒントになったのが、子供たちが遊んでいるシャボン玉だった。乳剤に表面活性剤を加えて直径約6 cmのシャボン玉を作ると、厚さ約1 μmの乳剤膜を作ることが出来、このシャボン玉が半乾き状態の時に二枚の切片で挟む

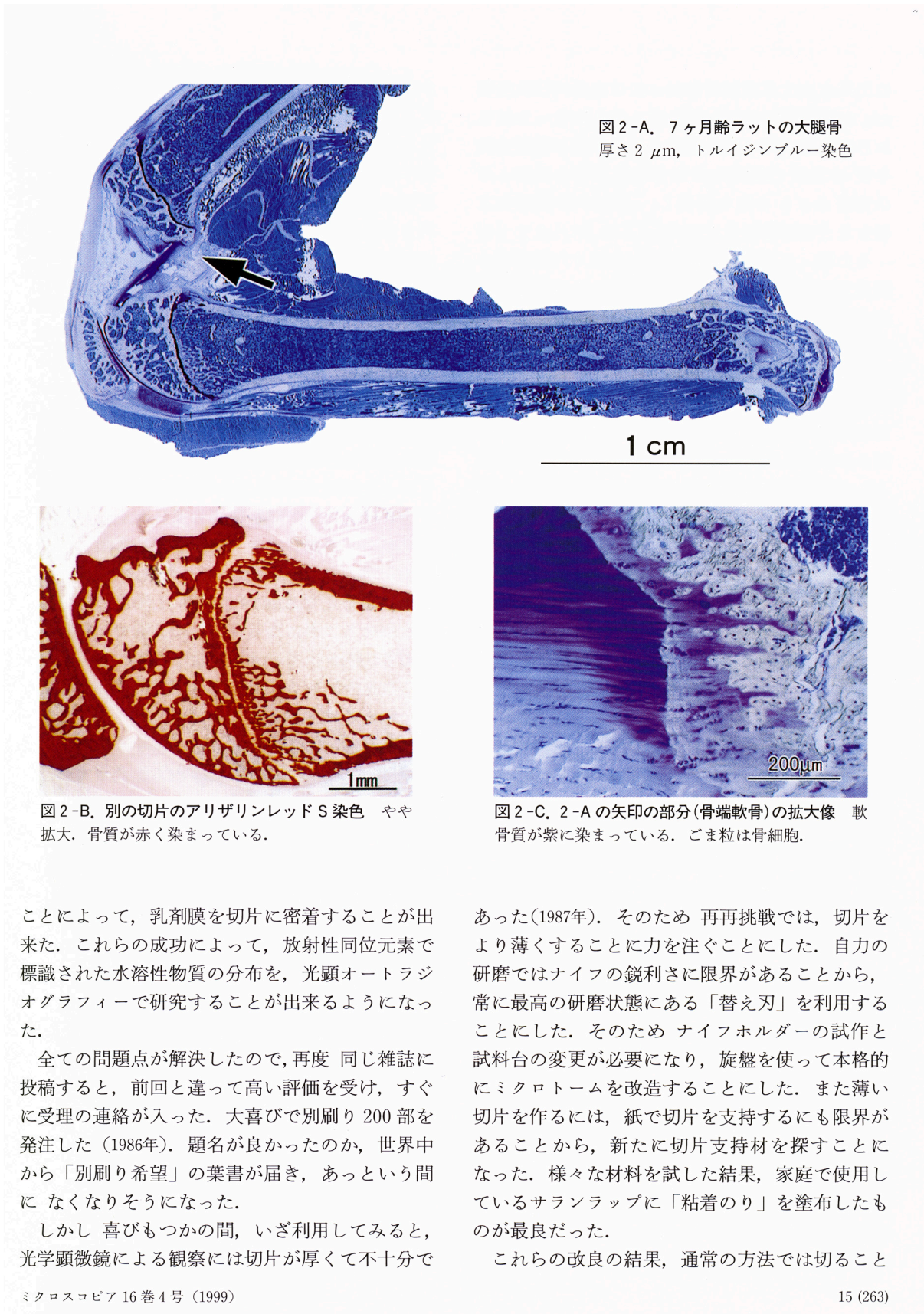


図2-A. 7ヶ月齢ラットの大腿骨
厚さ2 μm , トルイジンブルー染色

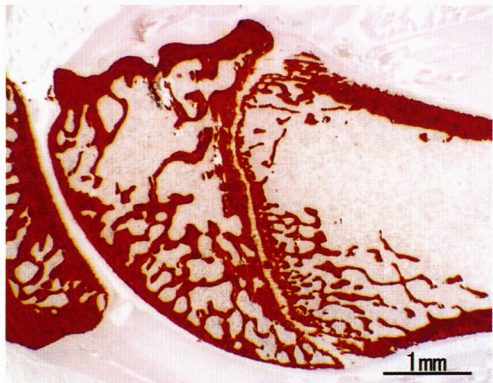


図2-B. 別の切片のアリザリンレッドS染色 やや拡大. 骨質が赤く染まっている.

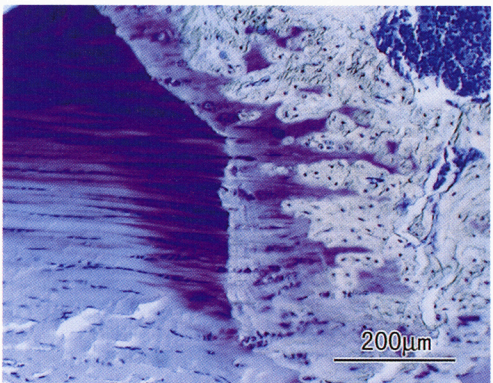


図2-C. 2-Aの矢印の部分(骨端軟骨)の拡大像 軟骨質が紫に染まっている. ごま粒は骨細胞.

ことによって、乳剤膜を切片に密着することが出来た。これらの成功によって、放射性同位元素で標識された水溶性物質の分布を、光顕オートラジオグラフィーで研究することが出来るようになった。

全ての問題点が解決したので、再度 同じ雑誌に投稿すると、前回と違って高い評価を受け、すぐに受理の連絡が入った。大喜びで別刷り200部を発注した(1986年)。題名が良かったのか、世界中から「別刷り希望」の葉書が届き、あっという間になくなりそうになった。

しかし 喜びもつかの間、いざ利用してみると、光学顕微鏡による観察には切片が厚くて不十分で

あった(1987年)。そのため 再再挑戦では、切片をより薄くすることに力を注ぐことにした。自力の研磨ではナイフの鋭利さに限界があることから、常に最高の研磨状態にある「替え刃」を利用することにした。そのため ナイフホルダーの試作と試料台の変更が必要になり、旋盤を使って本格的にマイクロトームを改造することにした。また薄い切片を作るには、紙で切片を支持するにも限界があることから、新たに切片支持材を探すことになった。様々な材料を試した結果、家庭で使用しているサランラップに「粘着のり」を塗布したものが最良だった。

これらの改良の結果、通常の方法では切ること

の出来ない大きな試料(4 cm × 12 cm)から厚さ 5 μm の切片を作ることが出来るようになった。これらの方法を用いて放射性トレーサーの静脈内投与後 3 秒後の組織内分布を追跡できるオートラジオグラフィ法を開発し、それが学位論文となった(1990年)。

その頃、日本を訪れていた全身切片作製装置の製造元(スウェーデン)の責任者が、この方法を代理店で聞きつけ、夜遅く訪ねて来た。実験動物の全身を凍らせた試料を用いて実演をして見せたところ、あまりにも簡単に薄い切片が作られるので、信じられないといった様子で、いつまでも眺めていた。

この改良した方法で作られた切片の最初の実用として、放射性カルシウムと放射性リン酸を投与した実験動物から作製した切片の硬組織(エナメル質、象牙質、骨)から顕微鏡下で微小領域(0.5 mm × 0.05 mm)を採取し、その試料中に含まれている放射性カルシウムと放射性リン酸の比を調べることによって、硬組織に輸送されているカルシウムとリン酸の比が細胞によってコントロールされていることを明らかにした(1990, 1994年)。また放射性カルシウムを用いて、血中からエナメル質へ輸送されるカルシウムの移動経路を研究し、世界で初めてカルシウムがエナメル芽細胞(エナメル質を作る細胞)の中を通過する時間を明らかにした(1997年)。しかし、成熟ラットの骨や歯を含んだ試料から切片を作るという初期の目標はクリアできず、切片作製法になお限界があることが明らかになり、再再再挑戦が必要となった。

別れ

成熟ラットの骨と歯を薄く切るためには、その硬さに負けないナイフが必要である。炭素特殊鋼で作られている替え刃の硬さでは不十分であることから、さらに硬い材料のタングステンカーバイドで作られたナイフ(一本刀)を用いることにした。その結果、成熟ラットの骨と歯から厚さ 2 μm の切片を作るという目標の目途がつき(1994年)、清水先生は「宝の山を掘り当てたね」と言って大変に喜んで下さった。このナイフの変更によって厚さ 3 μm 以上の切片であれば、連続して

かなりの数の切片(50枚以上)を作ることが出来るようになった。

しかし、こんなに硬い材料のタングステンカーバイドのナイフといえども、成熟ラットの骨や歯を切ることは大変なことで、使用中にナイフの鋭利さが失われたり、刃先が欠けたりして、厚さ 2 μm の切片を作ることが出来なくなる。それに、ナイフは高価(1本24万円以上)で、しかも作業性が悪かった(ナイフ交換時に再度調整しなくてはならなかった)。やはりこれが限界かとあきらめかけていた時、業者からタングステンカーバイド製の替え刃ナイフが市販されていることを知らされ、大喜びで取り寄せた。そしてすぐに替え刃が利用できるようにナイフステージを改良し、安くて鋭利なナイフ(3万円)を使用できるようにした。

その頃から14年間使用していた1号機の補修部品の手配が難しくなり、清水先生に相談して2号機を購入することにした。2号機はこれまでの問題点を考えて改造を行ない、1年半で希望の性能を出せるようになった。この装置で、成熟ラットの骨、歯から 2 μm の切片を作ることが出来るようになり、18年目の昨年の夏に「夢の切片」を追い求める旅は終了した。

しかし、清水先生は完成の2週間前に急に体調を崩され、「あとは頼むよ」の一言を残して帰らぬ人となった。これから始まる私一人の「応用への旅」には、どんな世界が待っているのだろうか。



図3. 全身凍結切片作製装置の前で

「夢の切片」の世界

夢の切片は、どんな世界を私たちにを見せてくれるのだろうか。固定、脱灰、包埋等の処理が不要なので、これまでの多くの問題点を解決してくれることは間違いない。

固定液や脱灰液によって組織中の酵素が失活しているのではないだろうか、蛋白が変性して免疫反応が起こらないのではないだろうか、といったこれまでの心配は不要となる。実際に酵素組織化学に応用した実験では、酵素の再活性を行なっても30分以上の反応時間を必要としていた反応が、今や1-2分となった。また免疫組織化学においても、従来の方法よりも強くて鮮明な反応結果が得られた。組織学分野では、大きな試料から切片を作るには長い日数を必要としていたが、この方法では試料の採取後1時間もしないうちに顕微鏡で観察できるようになった。しかもこの切片はほとんどの染色に利用することが出来る。光顕オートラジオグラフィの分野では、これまで不可能と考えられていた標識化合物の体内での動きを、投与後3秒目から研究することが出来るようになり、これまで研究することの出来なかった標識化合物の投与から1分以内の動きを明らかにすることが出来るようになった。

さらに組織中での元素分布の観察、赤外顕微鏡による生体分子の観察、遺伝子組織化学、微小領域の生化学的分析、硬組織形成過程の記録描写、硬組織成分の分析、マイクロビームX線回折法などへの応用。次から次へと夢が広がっていく。

おわりに

実際の光学顕微鏡観察には、厚さ3-5 μm 程度の切片で十分である。それにも関わらず、厚さ2 μm の切片作製にこだわった理由は、金属性ナイフで切れる限界は2 μm 程度であることと、厚さ3 μm の切片を安定的に作るには2 μm の薄切技術が必要だと考えたからである。そんな理由で、全て厚さ2 μm の切片の写真を示している。

成熟ラット(7ヶ月齢)の大腿骨からは、厚さ3 μm であれば80%程度、5 μm であればほとんど100%の確かさで良好な切片が得られる。当然、

薄切は石灰化度の低い試料ほど簡単であるが、11日齢ラットのように大きな試料から厚さ2 μm の無損傷の切片を得ることは難しい。図に示している程度の切片であれば80%程度、もう少し小さい試料(9日齢ラット)では、厚さ3 μm 程度の切片であれば、ほとんど100%良好な切片として得られる。

それにしても「人との出会い」は、本当に大切なことだ、とつくづく感じる。27年前に清水先生との出会いがなければ、だれもが不可能と信じて疑わなかった方法の完成に18年間も打ち込むことが出来ただろうか。今まで以上に「人との出会い」を大切にしたいと感じるとともに、私の経験と研究への思いを若い人たちに伝えたいと思うこの頃である。

参考文献

- 1) Kawamoto T., Shimizu M.: A Method for preparing whole-body sections suitable for autoradiographic, histological and histochemical studies. *Stain Technol.* 61:169-183, 1986.
- 2) Kawamoto T., Shimizu M.: Distribution of calcium and phosphate in cells of the enamel organ in the rat lower incisor. *Adv. Dent. Res.* 1:236-244, 1987.
- 3) Kawamoto T., Shimizu M.: Changes in the mode of calcium and phosphate transport during rat incisor enamel formation. *Calcif. Tiss. Int.* 46:406-414, 1990.
- 4) Kawamoto T.: Light microscopic autoradiography for study of early changes in the distribution of water-soluble materials. *J. Histochem. Cytochem.* 38:1805-1814, 1990.
- 5) Kawamoto T., Shimizu M.: Changes of the ratio of calcium to phosphate transported into the mineralizing enamel, dentin and bone. *Jpn. J. Oral Biol.* 36:365-382, 1994.
- 6) Kawamoto T., Shimizu M.: Pathway and speed of calcium movement from blood to mineralizing enamel. *J. Histochem. Cytochem.* 45:213-230, 1997.

かわもと ただふみ

昭和52年 東京電機大学工学部電子工学科卒業、歯学博士。鶴見大学歯学部RI研究センター 主任、生化学教室 助手。東京医科歯科大学歯学部 非常勤講師。研究センターの性格上、専門を問わず、色々な研究相談に応じる毎日である。研究テーマは硬組織の石灰化機構の解明で、とくに放射性カルシウムを自由に使用できることから、硬組織へのカルシウム輸送を主に研究している。中学生と高校生の子供がいることから「子供達に夢を」と地域活動に頑張っている。