The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	フリーズ･レプリカ法と急速凍結置換法
Author(s)	藤田, 尚男; 石村, 和敬
Citation	大阪大学低温センターだより. 1981, 34, p. 4-7
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/3527
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

フリーズ・レプリカ法と急速凍結置換法

医学部　藤　田　尚　男，　石　村　和　敬
（医学部　２４５）

西暦紀元前４世紀頃，アレキサンドリアのHerophilosやErasistratosによっておこなわれて以来，長く絶えていた人体解剖は中世末期，1316年にボローニア大学（イタリア）のMondino de Luzziによって復活した。滔々と寄せるルネッサンスの波にのって１５〜１７世紀のイタリアにはda Vinci，Vesalius，Falloppio，Eustachio，Fabricioなどの解剖学者が陸続として出現し，人体の構造が次々と明らかにされていった。まさに肉眼解剖学の開花である。

肉眼による観察は多くの新知見を生んだが好奇心に際限のない人間は生物を拡大して見ようとたくらむようになる。１５９０年にオランダのJanssen父子によって考案されたという組合せレンズがもとになって顕微鏡の発達をもたらし，これを用いての器官の観察が１７世紀頃よりさかんにおこなわれるようになった。その結果，１９世紀には人体のなりたちを組織のレベルで把握しようとする学問の勃興をもたらす。これが組織学である。光学顕微鏡の観察のみによる組織学はそのかたわれである細胞学とともに約１５０年間続く。２０世紀半ば，光学顕微鏡の限界に倦きた組織・細胞学者は，自分らの領域に，１９３０代にドイツで発明された電子顕微鏡を導入しはじめたのである。研究者のいちじるしい増加と長く続いた平和のお蔭もあって，組織をアルデヒド系固定液とオスミウム酸につけ，合成樹脂であるエポンに封じこめて厚さ0.05 μmくらいに薄切するという標本作製の型が確立し，あらゆる器官の，あらゆる組織の，あらゆる細胞の超微構造が約２０－２５年の間にすさまじいスピードで明らかにされていった。その結果，電子顕微鏡で観察し，新しいものが見つかる時代はまたたく間に過ぎ去ったのである。

人間の好奇心には際限がない，その後も，組織細胞学のための方法は色々と試みられ改良されつつある。その１つがフリーズ・レプリカ法である。組織を凍結して割断するというこころみはすでに古くからHall（1950），Steereら（1957）によってなされていたが，実用的な方法として確立されるのにはMoor（1961）の功績が大きい。そうしてようやく近年になって，この方法は生物学の研究に広く盛んに用いられるようになったのである。

現在用いられているフリーズ・レプリカ法は，動物や植物の組織をグルタールアルデヒドで固定し，グリセリンにつけたのちにフレオンガスと液体窒素に入れて凍結させ，真空中で割断し，その破面に白金と炭素を蒸着させてレプリカを作り，電子顕微鏡で観察するものである。この方法によって細胞の表面をつつむ細胞膜や，細胞内にある種々の膜構造が特有の割れ方をするのである。細胞の中にはミトコンドリアとよばれるエネルギー源をつくる小体や，小胞体とよばれる蛋白を合成して貯えるふくろや，作ったホルモンや酵素を貯え細胞外に放出する分泌顆粒とよばれる小体など種々の構造物が存在するがこれらの大部分は膜によってできている。これらの膜は生体膜とよばれ，すべてリン脂質の２分子層からなっており，その中に蛋白質がモザイク状に介在している（図１）。２分子層のリン脂質の疎水基は

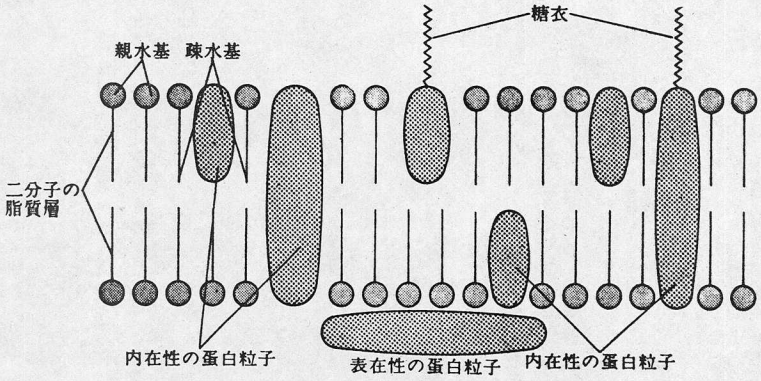

図1. SingerとNicolsonが提唱した生体膜の模式図

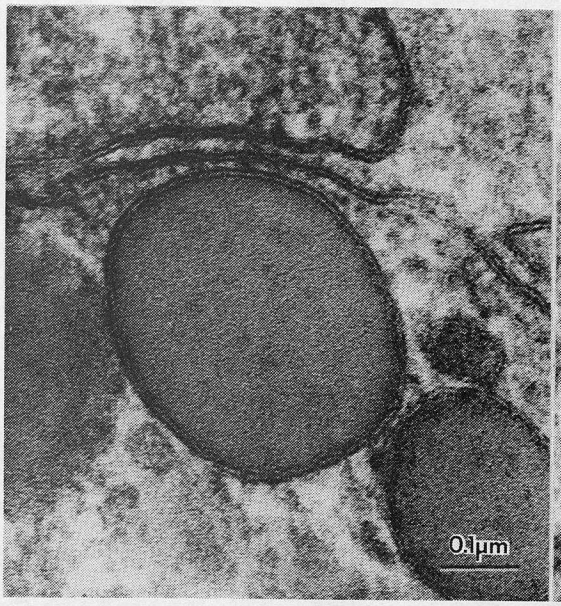

図2. 下垂体前葉細胞の分泌果粒が細胞膜に近づいたところの電子顕微鏡写真

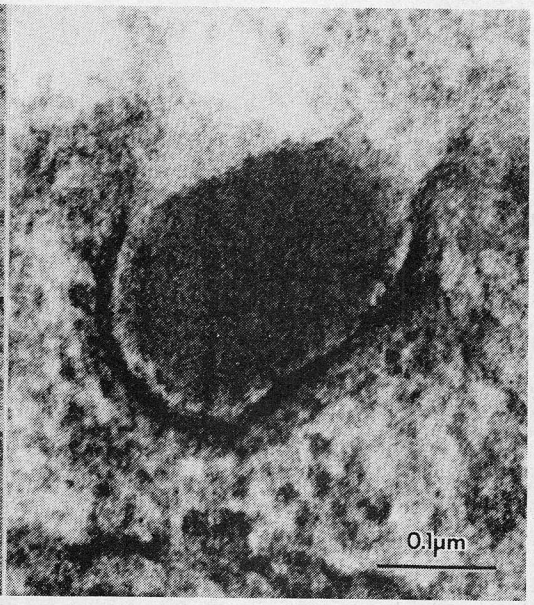

図3. 下垂体前葉細胞の分泌果粒の開口分泌像。このようにしてホルモンが細胞の外へ出る。

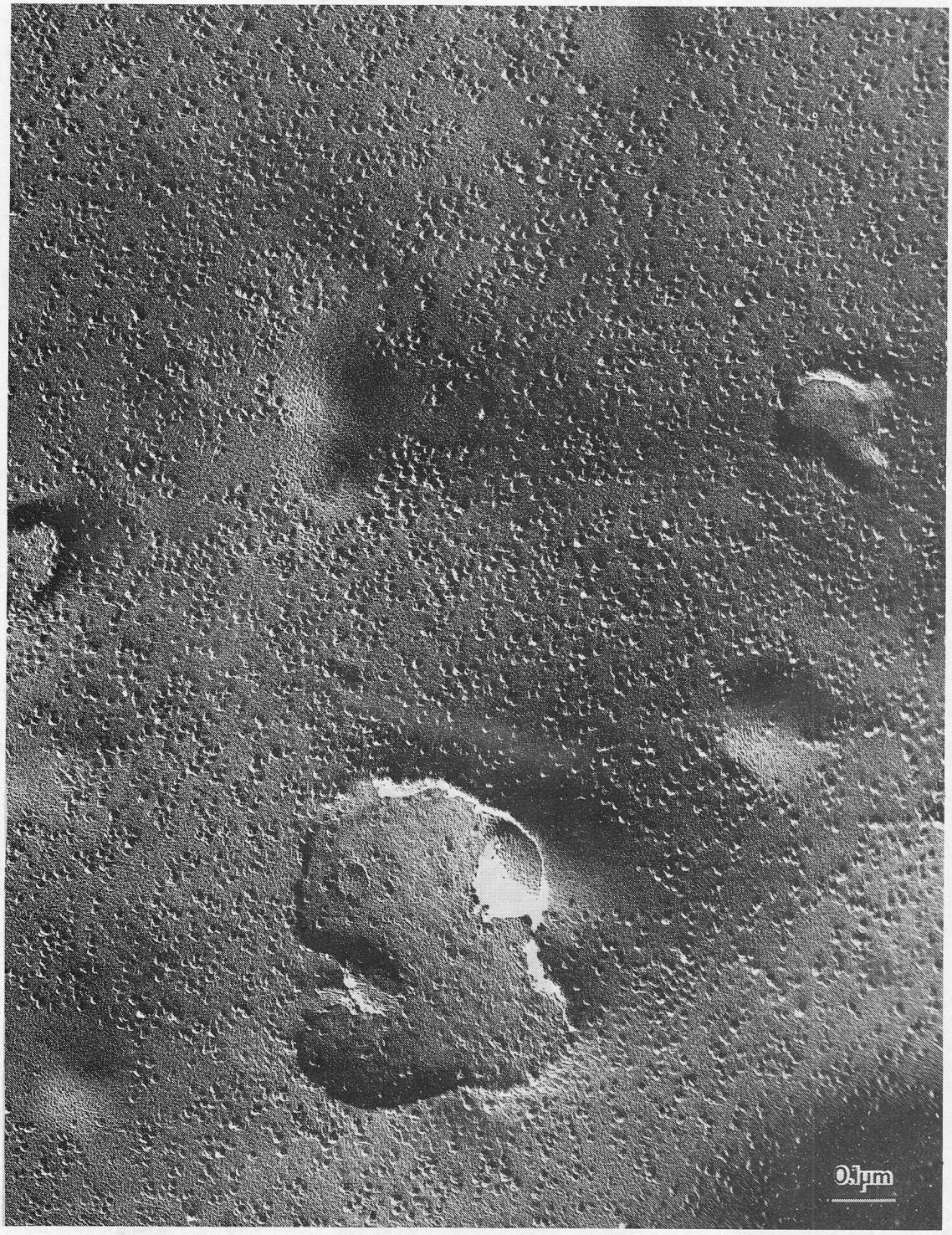

図4. 下垂体前葉細胞のフリーズ・レプリカ像。
細胞膜の割断面のレプリカ。ややふくらんだ感のある所は下に分泌果粒が来て細胞膜を押し上げていると考えられる。この部分には膜内粒子を欠いている。

たがいに相対峙しあい，親水基はたがいに外面を向いている。フリーズ・レプリカ法を用いると膜はこの疎水基の間で割れ，膜内に存在する蛋白粒子が露出する。これを膜内粒子とよぶ（図4）。

ペプチドないし蛋白性のホルモン（下垂体前葉ホルモン，膵臓のホルモンなど）や消化酵素（胃や膵臓などから出る酵素で，糖や蛋白，脂肪などを分解する作用をもつ）を分泌する腺細胞では，分泌物は細胞内で果粒状を呈し，限界膜につつまれており，分泌果粒とよばれている。この果粒は細胞外に放出されるにさきだち，細胞質の中を移動し細胞の表面に近づく。図2はその電子顕微鏡写真である。ついで，細胞膜と果粒限界膜が一部で融合し，その部分が開口し，果粒の内容物が外へ出る（図3）。これを開口分泌とよんでいる。この場合のフリーズ・レプリカ像を電子顕微鏡でみると（図4），分泌果粒の限界膜と細胞膜が融合する時には，その融合に先立ち，融合する部分の細胞膜と果粒限界膜の膜内粒子が排除されているのがわかる。つまり，膜内粒子のなくなった脂質の2分子層が融合して開口するのである。

分泌果粒の限界膜と細胞膜の融合と開口の瞬間の電子顕微鏡像をつかまえるのはきわめてむづかしい。近年考案された急速凍結置換法は液体窒素や液体ヘリウムに銅をひたし，生きている組織をこの冷却した銅に急速にぶっつけて凍結を起させ，細胞の機能を急激に停止させてオスミウム酸で置換固定し，標本を作製して電子顕微鏡で観察する方法である。この方法を用いれば膜の融合と開口の像が把握できるかもしれないとの希望をもって我々はこの瞬間の追求に励んでいる。