最新の高圧凍結装置とアプリケーション

伊藤喜子

ライカ マイクロシステムズ株式会社 〒108-0072 東京都港区白金 1-27-6 白金高輪ステーションビル 6F

要旨：一般的な電子顕微鏡用試料の前処理では、化学固定およびそれに続く脱水、置換の過程で細胞の微細構造変化や可溶性成分の流出などのアーティファクトが生じることが知られている。これを解決する手法として、細胞の状態を瞬時に止めることのできる凍結固定法が提唱されている。通常、水は凍る際、結晶化して細胞内で氷晶が形成される。この際、微細構造の破壊が起きる。そこで、電子顕微鏡観察レベルで構造を保持するためには、水を非晶質に凍結する必要がある。凍結手法には大気圧下で試料を急速に冷却する急速凍結法と、2100 bar (210 MPa) の圧力下で凍結する高圧凍結法がある。急速凍結法では非晶質に凍結できる深さが約5～20 μmであるのに対し、高圧凍結法では約200 μmと言われており、植物等のやや大きめな細胞、さらに組織レベルでの解析にも大いに役立つ手法となっている。凍結固定後のワークフローは、凍結状態で固定脱水を行った後、樹脂包埋および薄切して観察する凍結置換法と、凍結状態の試料をそのままクライオミクロトームで薄切して、cryo-TEMで観察するCEMOVISなどがある。また、凍結試料の凍結切削した断面をcryo-SEMで観察する試みもなされている。本総説では、高圧凍結の最新情報とそのアプリケーション例を紹介する。

The latest high pressure freezing systems and their applications

Yoshiko Ito

Leica Microsystems K.K., Shirokane-takanawa Station Bldg. 6F, 1-27-6 Shirokane, Minato-ku, Tokyo, 108-0072 Japan

Author for correspondence: Y. Ito, yoshiko.ito@leica-microsystems.co.jp

Summary: The conventional sample preparation for electron microscopy makes the artifacts in the process of dehydration and substitution, such as the changes of ultrastructure of cells and outflow of soluble components in the cells. Cryofixation has been proposed as the method to overcome the inconvenient and unexpected problems, by freezing the cells very rapidly. Because water freezes to be ice crystals with increase of the volume, and those formed in the cells destroy the ultrastructure. To preserve the ultrastructure of native cells at the resolution of electron microscopic level, it is required to make amorphous ice at the process of cryofixation. As the methods for it, rapid freezing to cool samples rapidly in normal pressure and high pressure freezing to freeze under 2100 bar have been proposed. In this review, the information of the latest high pressure freezing systems and their application has been introduced. The depth of good freezing in amorphous ice made by rapid freezing is 5 to 20 μm, on the other hand, that of high pressure freezing is about 200 μm. So the high pressure freezing can be applied for the electron microscopic analyses of cells and tissues at closed-to-native state. Workflows after cryofixation are, for example, freeze substitution and cryo-TEM observation of vitreous ice sections, or CEMOVIS. Furthermore, the surface of cryo-sectioned frozen samples has been observed by cryo-SEM.

Key words: electron microscopy, high pressure freezing, freeze substitution, CEMOVIS, CLEM, cryo-SEM

はじめに

生物試料を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察する一般的な手法として、高真空、電子線衝撃に耐えられるようにする事を目的に樹脂包埋法が用いられている。しかし、化学固定およびこれに続く脱水、熱重合の過程で、細胞の微細構造に様々なアーティファクトが生じることも示唆されている。例えば、細胞成分が流出したり、タンパク質の修飾や分解によって構造および抗原性が変化したりすることが知られている。そのため、酵素活性や抗体標識によるタンパク質の細胞内局在の解析、細胞内イオン局在の正確な解析は困難である。この問題を解決するひとつの手法として、凍結固定法が提唱されている。化学固定法と凍結固定法の比較を図1に示す。凍結固定 (この例では、高圧凍結法) した試料では化学固定した試料に比べて、細胞膜の凹凸が無くスムーズで、脂質二重膜が明瞭に観察されるなど、明らかな違いが見て取れる。その他、様々な所見から細胞が生きていた時に近い状態で保持されていると言える。

図1 固定法による微細構造保存性の違い。ラット海馬初代培養細胞を化学固定法 (A) および高圧凍結・凍結置換法 (B) で調製した。それぞれ上図の破線で囲んだ領域の高倍率像が下図である。

凍結技法概要

凍結固定では水を含む全ての細胞構成要素を保存することができる。しかし、氷晶形成による構造アーティファクトが問題となる。水は大気圧下で凍ると、結晶性の氷に転移し流動性を失う。常圧下で0℃まで冷却された水は、分子間に規則的な水素結合を持つ六方晶の結晶に形成される。水は、代表的な異常液体であり、結晶状態の構造には内部に大きな空間があるため液体状態(4℃)より体積が9%増加する。そのため、細胞内で氷晶が形成されると、水の移動や膨張により細胞の微細構造が破壊されてしまう。これは電子顕微鏡の解像度では重大な損傷として観察される(図2)。そこで、微細構造観察における生物試料の凍結固定では、氷晶が形成されにくい条件下での凍結が不可欠である。装置的に大別すると急速凍結法と高圧凍結法の2種類がある。急速凍結法は大気圧下で10⁴ K/sec以上(純水の場合10⁶ K/sec以上)の速度で試料を冷却する方法(Dubochet et al. 1988)、この中でも浸漬法と金属圧着法が広く用いられている(Heuser et al. 1979, Sitte et al. 1987)。

弊社では浸漬法・金属圧着法向けとして急速凍結試料作製装置EM CPCを、浸漬法専用機として環境制御型自動浸漬凍結装置EM GP(Resch et al. 2011)を提案している。浸漬法は試料を冷媒中に急速に投げ入れることで凍結を行う。装置の冷却などでよく用いられる液体窒素は、融点(-210℃)と沸点(-196℃)に近い(表1)。凍結温度として有効であるが、試料を液体

窒素に浸漬するとすぐ沸騰し、なかなかおさまらない。このとき、試料周囲には窒素ガス層が形成されているため、沸騰がおさまるまで試料表面に液体窒素が触れず冷却効率が悪い緩慢凍結となってしまう。そこで、浸漬法の冷媒としては、融点と沸点の差が大きい液体エタン(特に生体分子の氷包埋)、液体プロパン(細胞等の凍結)が用いられている。また、大気圧化で凍結効率が最も良いとされる金属圧着法は、熱伝導率の高い純銅ブロックを鏡面研磨し、酸化被膜付着防止の金メッキを施した金属ブロックを液体窒素(または液体ヘリウム)温度まで冷却し、ブロック表面に試料を圧着することで冷却を行う。ただ、液体窒素を用いた金属圧着法で非晶質氷層は水を含む表面から約10 μm、浸漬法では約5 μmと言われている。細胞の平均的な大きさから考えると、凍結深度が小さい。

これに対して、高圧凍結法だが、水は210 MPaでは-90℃まで過冷却できる(Kanno et al. 1975)。また、この圧力下では水は高粘度になり流動性が下がるため、結晶の形成速度が低下し、凍結速度が大気圧下での浸漬凍結法と比較して遅くても、氷晶形成を抑えることができる。この性質を利用したのが高圧凍結法である(Moor 1987, Studer et al. 1989)。高圧凍結法では非晶質凍結深度が約200 μmと報告されており(Studer et al. 1989)、細胞壁や大型の細胞などもある植物、さらに組織レベルでの解析に大いに利用できる可能性を持つ(Dahl and Staehelin 1989, 菅沼 1997, Osumi 2012)。弊社は高圧凍結装置としてEM PACT2, EM HPM100, およびEM SPFを提案している。

図2 氷晶による微細構造の破壊。A. 大気圧下で凍結した赤血球, B. *C. elegans*

最新の高圧凍結装置

高圧凍結装置は、加圧と液体窒素による冷却をミリ秒単位でシステム化し、試料装填から凍結済み試料の回収を安全に再現性よく行えるようにしたものである。加圧方式には、A: インナープレッシャー方式と、B: アウタープレッシャー方式がある(図3)。

弊社のEM PACT2は加圧方式Aを、EM HPM100は加圧方式Bを採用している。また、EM SPFは自己加圧方式という加圧方式Aの変法を採用した装置である。

EM PACT2は圧力伝達液(通常メチルシクロヘキサン)を介した加圧(210 MPa)と連動して、試料に液体窒素のジェット流(10 bar)を吹き付ける。試料キャリアー内だけのピンポイントの加圧となるため比較的コンパクトな装置サイズに設計でき、キャスターに載せる事でバリアフリーな実験室内では、移動が容易となっている(W910mm×D630mm×H930+890mm、本体のみ重量99kg)。凍結の際、平板試料キャリアーは図3Aのように試料ポッド内に固定されている。左側が底、右側が試料となっており、圧力伝達液は試料キャリアーの底にある小孔を介して試料キャリアー内部に圧力を加える。本装置は直径1.5mm以下、厚さ200 μm程度

表1 各種冷媒の物性

	ETHANE エタン	PROPANE プロパン	ISOBUTANE イソブタン	ISOPENTANE イソペンタン	NITROGEN 窒素	HELIUMU ヘリウム
分子式	C ₂ H ₆	C ₃ H ₈	i-C ₄ H ₁₀	i-C ₅ H ₁₂	N ₂	He2
分子量	30.07	44.1	58.12	72.15	28.01	4.003
融点 (°C)(101.32kPa)	-183.3	-187.7	-159.6	-159.9	-210	-272.2
沸点 (°C)(101.32kPa)	-88.6	-42.1	-11.7	27.8	-195.8	-268.93
ガス比重 (AIR(空気)= 1)(0°C, 101.32kPa)	1.038	1.522	2.066	2.49	0.967	0.1381
臨界温度(°C)	32.4	96.8	135	187.2	-146.9	-267.96
臨界圧 (MPa)	4.73	4.12	3.53	3.23	3.29	0.227
蒸発潜熱 (kJ/kg)(BOILING POINT(沸点) 101.32kPa)	489.3	425.7	366	342	204	20.4
気体密度 (kg/m ³)(0°C, 1atm)	1.357	2.01	2.76	3.0514	1.251	0.1785
液体密度 (Kg/L)(沸点)	0.546	0.582	0.601	0.6245	0.806	0.125
燃焼限界 % (空気中)	3~12.5	2.2~9.5	1.9~8.5	1.3~8.0	(不活性)	(不活性)
備考	無色無臭	無色無臭	無色 わずか臭	無色無臭	無色無臭	無色無臭

の試料を凍結することが可能である。他にも多様な試料キャリアーがあり、様々な目的に対応している(図4)。図4Aは組織(植物の葉など)の凍結向けの平板試料キャリアーである。また、懸濁試料を吸引して凍結する銅製の試料チューブ(内径350 μm)もある。桿菌等を試料チューブに詰めると長軸方向に揃ってしまうことがある。これを避けたい場合、メンブレンキャリアー(図4B)を用いる。その他フリーズ・フラクチャ用(図4C), biopsy用(図4D)などのキャリアーがある。

EM HPM100が採用している加圧方式Bでは液体窒素のジェット流を吹き付けることでキャリアー外から加圧しながら冷却を行う(図3B)。図3Bでは、ミドルプレート内に、2枚の平板試料キャリアー(図6Aタイプ)で試料をサンドイッチして格納し、浅い溝が彫ってあるハーフシリンダーで上下を挟むことでキャリアーの上下に液体窒素の流路を作っている。ちょうど円筒形になるよう3パーツを合わせ、本体に装填する。圧力伝達までの空間密閉の媒体としてエタノールを自動装填し、続いてコンプレッサーで加圧した液体窒素がジェット流となってシリンダー内の2本の流路の流れ、加圧と凍結を行う。動水圧と同様、流れ方向に対して垂直に圧力が加わる。この圧力は液体窒素の単位面積当たりの運動エネルギーに等しい。これにより試料キャリアーへの210 MPaの加圧を実現している。

この方式のメリットはより広い試料に対応可能な点である。本装置では最大直径5 mmの試料まで凍結可能であり、組織のよりワイド領域へと応用が広がっている。しかしながら、加圧メカニズムが最も大型となるため比して装置サイズも大きい(W713mm $\times$ D1364mm $\times$ H1283mm, 340kg)。キャスターも搭載しているが装置可動性はあまり考えない方が良いでしょう。HPM100の試料キャリアーは2つ1組となった2枚貝のような

図3 高圧凍結装置の加圧方式。A. インナープレッシャー方式, B. アウタープレッシャー方式
弊社の高圧凍結装置EM PACT2ではAを, EM HPM100ではBを採用。

構造になっており、その間に試料を装填する(図5)。目的に合わせ20種程度あり、ここでは、代表的なものを例にあげる。平板試料キャリアーには外径3 mmと6 mmの2種あり、図6では、外径3mmのものをあげる。図6A, Bに示すように平板試料キャリアーには、上下・片面に様々な深さがあり、径が同じもの同士は上下組み合わせ可能である。また、フリーズフラクチャ

図4 EM PACT2の試料キャリアー。A. 平板試料キャリアー, B. メンブレンキャリアー, C. フリーズフラクチャ用キャリアー, D. biopsy用キャリアー。メンブレンキャリアーにはくぼみの深さが0.1 mmのものと0.2 mmのものがある。

図5 EM HPM100への試料装填方法
ボトムキャリアーの中に緩衝液(氷晶防止剤は添加しなくてもよい)と試料を入れ、トップキャリアーで蓋をする。緩衝液がキャリアーからあふれたり、キャリアーのくぼみに気体が入らないよう注意する。

用としてシリンダリカル型(図6C), ドーム型(図6D), およびフラットトップ型(図6E)の3種類のキャリアがある。こちらも平板キャリア同様, フリーズ・フラクチャ用キャリア同士なら目的に合わせて組み合わせ可能である。

加圧方式Aの変法として, 自己加圧式の凍結法が提唱され(Leunissen and Yi 2009), EM SPFを製品化した。加圧メカニズムを持たないため装置サイズが小さく(W800mm×D1200mm×H900mm, 重量70 kg) 高压凍結装置としては比較的安価である。しかしながら, 本手法では, チューブ状キャリアに装填できる試料のみ凍結可能となるため懸濁試料など小さな試料に限定して有効である。U字型の銅チューブに懸濁

試料を装填し, 端を密封する。このUチューブの両端のみを液化プロパンに浸漬し冷却すると, 両端で氷晶が形成され水分が膨張しチューブ中央のカーブしている部分で内圧が上昇する(図7)。その後, Uチューブ全体を冷媒に投入する。Uチューブ中央部では試料溶液が加圧凍結されることになる。本装置では, この一連の作業の再現性を確保するため, 冷媒の温度管理, 凍結ごとの冷媒から試料までの高さ測定や, 予冷及び浸漬加圧凍結までのタイミング調整が自動化され, 冷却室素ガスで温度コントロールされたクライオチャンバー内では, 銅チューブの切出しなどが行える治具が内蔵されている。

凍結後のアプリケーション1ー凍結置換法, CLEM

凍結固定後のアプリケーションは様々な手法(図8)が提案されている, ここでは最もポピュラーな凍結置換法, その中からCLEMに関して, 最新の凍結切削テクニックとしてCEMOVIS, さらに, cryo-SEM法について述べる(その他の総説として伊藤と宮澤2010)。

図6 EM HPM100 試料キャリアー

平板試料キャリアーには表裏両側にくぼみがあるタイプ(A)と片側のみにくぼみがあるタイプ(B)がある。それぞれくぼみの内径が2 mmと5 mmがある。フリーズフラクチャ用キャリアーはシリンダリカル型(C)とドーム型(D), およびフラットトップ型(E)がある。それぞれ内径2 mmと5 mmがある。

図7 EM SPFにおける凍結

図8 凍結固定後のアプリケーション

凍結置換法では細胞が凍結した状態で固定と脱水を行うため、脱水による細胞成分の流出や微細構造変化が最小限に抑えられると言われている。そのため、形態学的な研究はもちろん、免疫細胞化学的手法による生体物質の局在解析にも最適である。弊社では凍結置換法に必要な温度環境コントロールを自動で行うEM AFS2を提案している。これにはオプションで冷却環境下でのディッシュプロセッサであるEM FSPを取り付けられる。試薬をセットしておけば、入れ替えや希釈が自動で行われる。さて、凍結置換法だが、凍結した試料を-90~-80℃の置換溶媒に入れ脱水を行い、徐々に昇温して樹脂包埋を行う。置換液は、目的に合わせ、構造解析を中心とするなら2~4% 四酸化オスミウム・アセトンを用い、免疫電子顕微鏡法向けには、メタノール・ウラン溶液など化学固定剤を含まない置換液(または、ごく低濃度の化学固定剤入り)を用いて脱水・置換を行う。樹脂も同様で、微細構造観察の場合は、室温まで昇温した後、一般的なエポキシ樹脂包埋をすると良いだろう。しかし、免疫電子顕微鏡法では、エポキシ樹脂は、抗体の反応性が悪く非特異反応も起きやすいため、低温下で紫外線重合が出来るLR系、Lowicryl系の樹脂を用いる報告が多い。目的に応じてこれらを組み合わせて選択をすると良いだろう(なお、ここでは割愛するが、凍結置換法の各論に関しては、多くのすぐれた書籍・報告がある。それらを参照されたい)。

また、近年、光学顕微鏡(蛍光顕微鏡)と電子顕微鏡で同じ領域を観察するCLEM(相関顕微鏡法; Correlative Light

and Electron Microscopy)が注目されている。生きたまま細胞を観察できる光学顕微鏡にて低倍広視野で目的領域(例: 特定のタンパク質が集積している部分)を特定した後、電子顕微鏡でその領域を高解像度で観察する。しかし、一般的な光学顕微鏡像と電子顕微鏡像とでは倍率のギャップが大きく、電子顕微鏡で目的領域を見つけるにはこれらの橋渡しが必要である。弊社の高圧凍結装置EM PACT2およびEM HPM100にはそれぞれソリューション方式のCLEM用アクセサリであるLive CellキットおよびCLEMシステムがある。ここではEM PACT2を用いた手法について紹介する(Verkade 2005, 2009)。Live CellキットはLive Cellキャリアー(図9)とサファイアディスク(直径1.4 mm)とNi製のファインダーグリッド(直径1.48 mm)から構成される。Live Cellキャリアーは中央に直径1.5 mmのくぼみと直径1 mmの穴がある。Live Cellキャリアーのくぼみに細胞を播種したサファイアディスクとファインダーグリッドをはめて(図10)蛍光顕微鏡で観察し、目的領域を特定する。ファインダーグリッドの番地を見て、その領域がどの番地にあるのか確認しておく。この試料を高圧凍結-凍結置換し、樹脂包埋する(図11)。樹脂ブロックからキャリアーとサファイアディスクを除去すると、細胞層とファインダーグリッドが樹脂ブロックに残る。サファイアディスクにカーボン蒸着しておく、細胞層を樹脂ブロック側に残してサファイアディスクのみ剥離しやすくなる。実体顕微鏡下でファインダーグリッドの番地をもとに目的領域を狙ってトリミングし(図12)超薄切片を作製することで、光学

図9 Live Cell キャリアー

図11 Live Cell キャリアー・システムの樹脂包埋後のトリミングとキャリアーの取り外し手順

図10 Live Cell キャリアーにファインダーグリッド (Ni) をセットしたところ

図12 ファインダーグリッドをみながらトリミングで細胞エリアを追込む

顕微鏡像と相関を取りながら電子顕微鏡で観察できる。また、EM PACT2には専用の高速試料装填システムEM RTSがある。本システムを組み合わせることで、試料をセットしてから2.5秒で凍結ができる。専用の試料ローダーに試料を取り付けた状態で光学顕微鏡観察を行えば、観察後2.5秒で試料の凍結が完了する。

凍結後のアプリケーション2—CEMOVIS, cryo-TEM法

次に、ガラス様(非晶質)に凍結した試料を非晶質状態のまま凍結切削して cryo-TEM 観察するCEMOVIS (Cryo Electron Microscopy Of Vitreous Sections) について述べる。ガラス状に凍った試料は、トリミングの精度とサイズが良ければ、30nm ~ 100nm の連続切片を作製する事が可能である。この時、トリミングナイフ、超薄切片作製用のナイフには、ダイヤモンドを用いると良い。ただし、非晶質の氷は135K (-138.15℃) 以上になると相転移して氷晶を形成してしまう(Dubochet and McDowell 1981)。そのため、凍結切削からcryo-TEM観察までの全プロセスで厳密な温度管理が必要である。弊社のクライオミクロームはウルトラミクロームEM UC7に凍結切片作製システムEM FC7を取り付けて用いるものである。本装置は-185℃ ~ -15℃の範囲で任意に温度設定した冷却室素ガス雰囲気下で切削を行うことができる。クライオチャンバーの手前左側に液体窒素プールがあり、そこから生成される冷却室素ガスがチャンバー内から常に一定量フローアウトする構造になっている。精密作業と実体顕微鏡観察のためオープントップとなっているが、チャンバー内部は常に陽圧になるため、チャンバー表層で生成される霜がチャンバー内に落ち込みにくく、長時間、快適に作業を行うことができる。しかしcryo-TEM観察では、僅かな霜の付着が切片の観察を著しく妨げるため、さらなる防霜対策としてクライオスフェアという防霜グローブボックスを提案している。これは、クライオミクロームのほぼ全体を収納できる簡易式グローブボックス(図13)で、EM FC7からフローアウトしたガス窒素がクライオスフェア内に充滿したのち、クライオスフェアと机との接続部に設けた隙間からフローアウトする構造になっている。さらに、窒素ガスをクライオスフェア外から積極的に送り込むことも可能である。高温多湿な日本においても気候・天気にかかわらずクライオスフェア内の湿度を10%程度に保つことができ、図14のように霜の発生を大いに改善することができる。だが、いずれの環境でも、窒素ガスでパージされたチャンバー内は非常に乾燥しており、試料が静電気を帯びやすく、切削するという行為自体も静電気を発生させてしまう。この静電気により切片の操作が著しく困難になる。そこで、静電気制御装置CRIONを用いて除電をしながら切削を行い(図15)、さらに、薄い脆く弱い切片を物理的な圧着などしないで蓄電機能により、グリッド上の支持膜への静電的接着を行う。

CEMOVISでは凍結固定法の利点に加え、電子染色を行わず生体分子由来の主に位相コントラストによって観察を行うため、生体分子の性質を反映した像が得られる(図16, 17)。適切な位相コントラストを得るためには、切片が薄いほど良く、厚さ30nm ~ 40nm程度の切片を作製したい。この時、トリミングのサイズ、特に幅が重要で、ダイヤモンド製のトリミングナイフを用い、50 μm以下の幅まで精密に加工すると良いだろう。これにより、無染色でも高いコントラストで膜構造などを観察することが出来る。しかし、生きた状態に近い像が得られるCEMOVISだが、弾性のない氷をドライ切削することに起因す

るCEMOVIS特有のアーティファクトも存在する。ナイフマーク、クレバス、チャター、および圧縮などである(Amoudi et.al. 2002, 岩崎ら 2012)。その一方、切片を作製した残りの試料断面にはこのようなアーティファクトは生じにくく構造保存性が高い。そこで、著者らは現在この断面をcryo-SEMで観察する手法に取り組んでいる。組織全体への、よりワイドな領域の観察には、

図13 UC7及びFC7クライオミクロームシステムとクライオスフェア概観

図14 凍結切削中の霜の有無

図15 マイクロマニピレーターシステムとCRIONによる 静電気を利用した切片回収テクニック

優れた方法である。前述のEM FC7のチャンバー側面に試料を取り出すための穴を開けたEM FC7Tから真空トランスファー装置EM VCT100を用いて、切削した試料を冷却状態のままcryo-SEMに搬送することができる(図18)。cryo-SEMのステージ温度をコントロールして試料をわずかにエッチングすれば、二次電子像を用いて細胞構造を観察することができる。また、EM VCT100をシャトルシステムとして使う事で、一度観察した試料を再びEM FC7Tや他の前処理装置に搬送して戻すこともできるので、切削と観察を繰り返して目的部位を探すことも可能である(伊藤ら2012, 西野ら2012)。

まとめ

最新の高圧凍結技法について、装置とその原理及び使用方法を解説した。さらに、凍結後の試料作製技術を凍結置換

法とCLEM, cryo-TEM法としてCEMOVISに加え、筆者らが最近取り組んでいるcryo-SEM法を紹介した。本報告が皆様の研究の参考になれば幸いである。

引用文献

- Al-Amoudi, A., Dubochet, J., Studer, D., (2002) Amorphous solid water produced by cryosectioning of crystalline ice at 113K. *J Microscopy* 207:pp.146-153
- Dubochet, J., McDowell, A. W. (1981) Vitrification of pure water for electron microscopy. *J Microscopy* 124: RP3-RP4.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W., and Schultz, P. (1988) Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys* 21: 129-228.
- Dahl, R. and Staehelin, L. A. (1989) High-pressure freezing for the preservation of biological structure: Theory and practice. *J Electron Microsc Tech* 13: 165-174.

図16 大腸菌のCEMOVIS. 高圧凍結後、凍結超薄切片作製(30 nm)

図17 酵母のCEMOVIS. 高圧凍結後、凍結超薄切片作製(30 nm).

EM FC7T

日本電子 JSM-6701F

EM VCT100

図18 Cryo-SEM法フロー。左上クライオスフェアに入ったトランスファー機能付クライオミクロームシステムUC7+FC7Tに、VCT100シャトルを取り付けたところ、左下 真空クライオトランスファーシステムVCT100のシャトルの接続部アップ、右上 VCT100シャトルで凍結サンプルをSEM (JSM-6701F)に挿入しているところ。

- Heuser, J. E., Reese, T. S., Dennis, M. J., Jan, Y., Jan, L., and Evans, L. (1979) Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J Cell Biol* 81: 275-300.
- 伊藤喜子, 宮澤淳夫 (2010) クライオ電子顕微鏡法. 実験医学 28: 39-44.
- 伊藤喜子, 西野有里, 宮澤淳夫 (2012) 日本顕微鏡学会第56回シンポジウム 要旨集 pp 46-49.
- 岩崎憲治, 宮崎直幸, 伊藤喜子, 高木淳一 (2012) CEMOVI試料作製法, 顕微鏡 47: 44-50.
- Kanno, H., Speedy R. J., and Angell, C. A. (1975) Supercooling of water to -92°C under pressure, *Science* 189: 880-881.
- Leunissen, J. L., and Yi, H. (2009) Self-pressurized rapid freezing (SPRF): a novel cryofixation method for specimen preparation in electron microscopy. *J Microsc* 235: 25-35.
- Moor, H. (1987) Theory and practice of high pressure freezing. In: Cryotechniques in Biological Electron microscopy, Steinbrecht, R.A., Zierold, K. (eds), Springer-Verlag, Berlin pp 175-191.
- 西野有里, 伊藤喜子, 宮澤淳夫 (2012) 日本顕微鏡学会第56回シンポジウム 要旨集 pp 50-53.
- Osumi, M. (2012) Visualization of yeast cells by electron microscopy. *J Electron Microsc* (Tokyo) 61: 343-365.
- Resch, G. P., Brandstetter, M., Pickl-Herk, A. M., Königsmaier, L., Wonesch, V. I., and Urban, E. (2011) Immersion freezing of biological specimens: rationale, principles, and instrumentation. *Cold Spring Harb Protoc* 2011: pdb-top118.
- Sitte, H., Edelmann, L., and Neumann, K. (1987) Cryofixation Without Pretreatment at Ambient Pressure. In: Cryotechniques in biological electron microscopy, Steinbrecht, R., Zierold, K. (eds), Springer Berlin Heidelberg, pp 87-113.
- Studer, D., Michel, M., and Müller, M. (1989) High pressure freezing comes of age. *Scanning Microsc Suppl* 3: 253-268.
- 菅沼龍夫 (1997) 高圧凍結置換法. 電子顕微鏡 32: 110-112.
- Verkade, P. (2009) Moving EM: the Rapid Transfer System as a new tool for correlative light and electron microscopy and high throughput for high-pressure freezing. *J Microsc* 230: 317-328.
- Verkade, P. (2005) Correlative Light and Electron Microscopy with High Time Resolution and Ultrastructural Preservation. *Microsc Microanal* 11 (Suppl 2): 144-145.

Received: 3 February 2013