

# UM-2型 超マイクロトームの設計とこれによる連続切片の観察

## Type UM-2 Ultra Microtome for Electron Microscopy, Its Design and Application for Serial Sectioning

土倉 秀次\* 大沼 嘉郎\*\* 古谷 弘\*\*  
 Hidetsugu Tsuchikura Yoshiro Onuma Hiroshi Furuya  
 黒羽 逸平\*\* 桜井 恒文\*\*  
 Ippei Kuroha Tsunebumi Sakurai

### 内 容 梗 概

細胞組織を電子顕微鏡で検鏡するためには、組織を適当な物質に包埋し、これを薄切して $0.05\sim 0.01\mu$ 以下の厚さを持つた超薄切片を作らなければならない。このような超薄切片を作る技術は近年急速に進歩をとげた。超薄切片作製の超マイクロトームでは、このような微細な送りを誤差なしに正しく送ることが必要で、現在各種の超マイクロトームが製作されている。

われわれは鋼板の弾性変形をナイフの送りに応用した弾性変形型超マイクロトームの試作研究を行い、これを商品化した。

この超マイクロトームでは毎回の切断が確実で、いわゆる連続切片が常時困難なしに得られる性能を持っている。

設計上の特長と、連続切片作製のための実験および結果について述べる。

### 〔I〕 緒 言

超マイクロトームの最初のもは Pease, Baker 両氏によつて改良された Spencer No. 821 型<sup>(1)</sup>のもので、光学顕微鏡用マイクロトームの $1\mu$ 送りを $0.1\mu$ に改造したものであつたが、その後、超マイクロトーム性能向上のための実験が繰り返され、機構上最も機械誤差を生じやすい問題点がかなりわかつてきて<sup>(2)</sup>、従来の光学顕微鏡用マイクロトームとは別個の機構上の特長を持つた超マイクロトームが設計製作されるようになった。試料切断に要する送りは $0.05\sim 0.01\mu$ というきわめて微細な送りであるが、送り機構にも数種の機構が考案されている。代表的な例では金属棒の熱膨脹、あるいは磁歪効果を送りに利用したもの、ピッチの傾斜のゆるやかなスクリューによる送りを用いたもの、「てこ」の支点の移動をレバー比で減速する方式などがある<sup>(3)(4)(5)</sup>。

超マイクロトームでは送りが正確に送られることが必要であるが、同時に機械の運動に際して機構上送りを乱す機械誤差因子を取のぞくことが重要な問題である。機械誤差因子には、機械各部の振動、熱膨脹、静摩擦および摩擦係数変化による送りの脈動、試料運動時の通過点の不同等があり、これらの影響が $0.05\sim 0.01\mu$ 以上あると連続切片の作製は不可能である。

われわれは第一に機械の送りに鋼の弾性変形を利用した。鋼の弾性変形は材料を吟味すれば荷重対変形率は直線的で、かつヒステリシスのないすぐれた特性を有することが実験的にたしかめられた<sup>(6)</sup>。

第二に機械の機構上、前記の機械誤差をできるだけ排

除することと留意し、完全に除去できぬ問題に対しては、これをできるだけ吸収せしめる配慮を行つた。

以上のような設計上の特長を持つた試作機で、実際に切片作製実験を行い、使用上の便宜を考慮しつつ改良を加え、常時容易に連続切片が得られる性能にたちいたつたので、これを商品化した。

以下機械の設計ならびに連続切片作製に関する実験について記す。

### 〔II〕 UM 2型超マイクロトームの機構

#### (1) 設計の方針

- (i) 超マイクロトームの送り機構としては鋼の弾性変形送りを用いた。2枚の鋼の弾性板を弱いつる巻きバネで連続的荷重を加えて撓ませ、連続送りを行わせた。
- (ii) 機構上試料の回転運動とナイフの送り運動に分け、両機構を分離、相互的に生ずる誤差を除去して誤差因子を単純化した。
- (iii) 送り機構からは直接滑動、嵌合などの接触による機構を排除して摩擦の影響を避けた。
- (iv) 試料の動き方を従来の往復運動方式から一方向回転方式にして試料の切削面をナイフ双面で擦過しない方式にした。
- (v) 試料の回転運動を規正するため Watson の摺動機構を採用し、試料の回転平面運動における浮動を防止した。
- (vi) 大多数のマイクロトームでは機械中に伝動歯車、摩擦車などの使用は避けられない。運転時これらの装置から生ずる振動はその振幅が容易に $0.1\mu$ 以上に達することが想像されるが、これらの微弱な

\* 日立製作所中央研究所

\*\* 日立製作所多賀工場

振動がナイフおよび試料に到達するまでに吸収されるようバネ連結とした。

(vii) 連続切片の作製に関連して、ナイフの自在方向調節装置を附し、試料面とナイフの平行をとりやすく設計した。

(2) 機構の概要

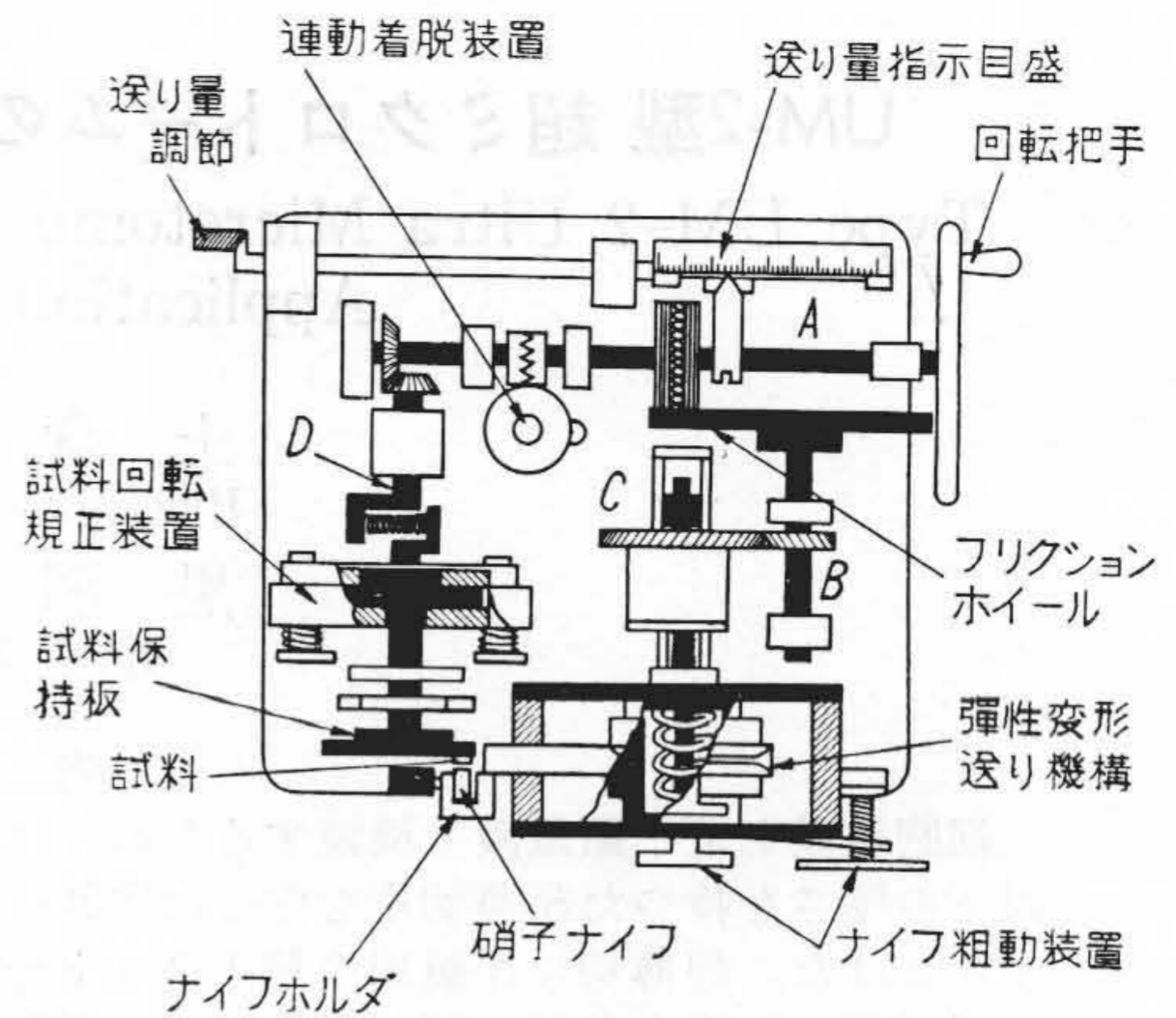
第1, 2図はUM-2型超マイクロトームの機構概要図である。回転把手の運動は原動軸(A)を回転せしめ、フリクションホイールを介して(B)軸を回転せしめる。(B)軸の回転は平歯車を介してスクリュー(C)を移動せしめ、スクリュー(C)はその一端に固着されたつる巻バネを圧縮して弾性板に荷重を与える。弾性板上に装着されたナイフ支持部は弾性板の撓みにつれてナイフを試料方向に前進せしめる。一方原動軸(A)は連動着脱装置、傘歯車を介して試料回転軸(D)を回転し、連結バネを介して試料保持板を回転せしめる。

この機構図で明らかなように試料運動機構とナイフ送り機構はそれぞれ独立し、これらが連動着脱装置を介して同時運動を行うよう配置した。

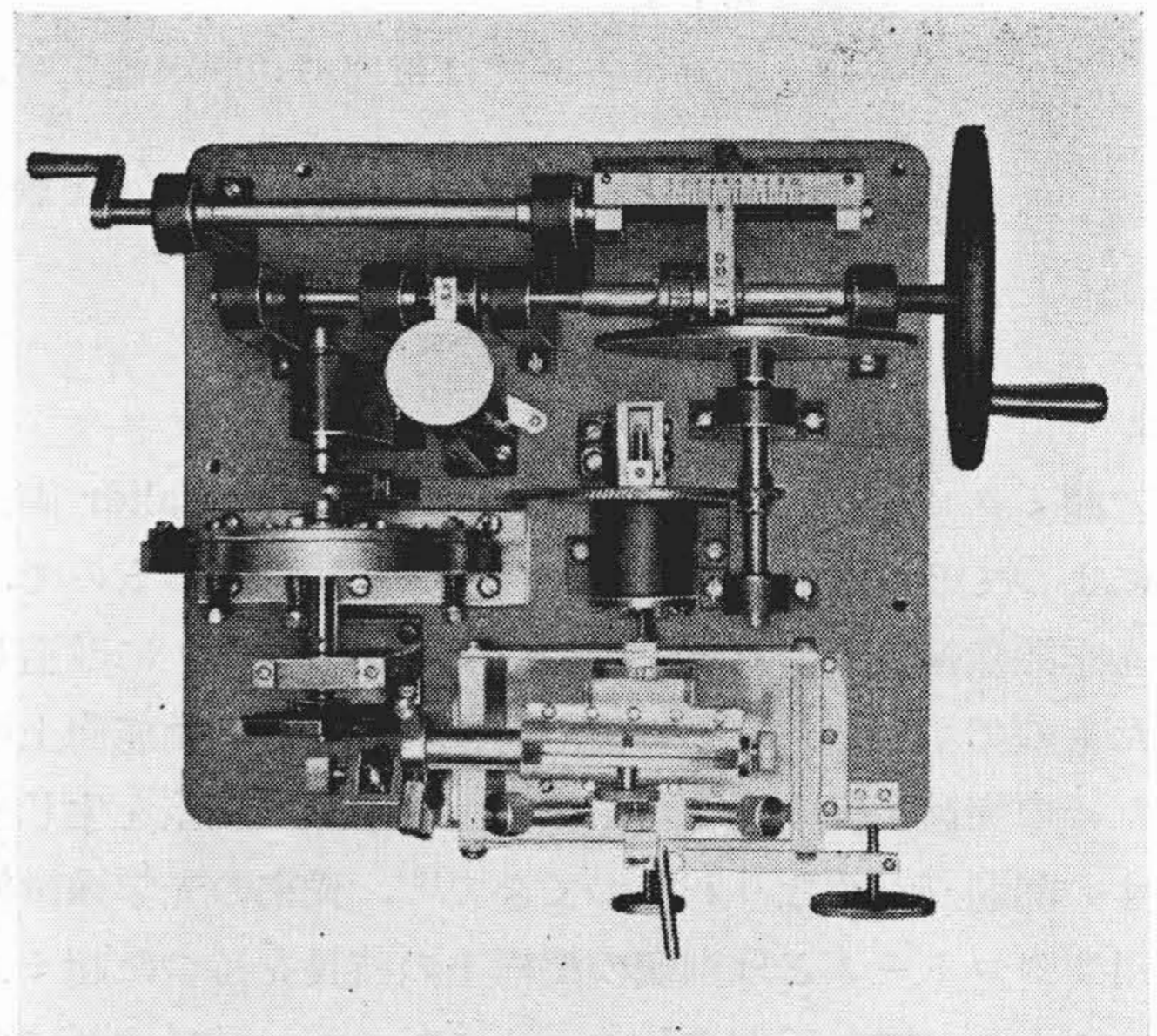
ナイフの送りはスクリュー(C)の動きによるつる巻バネの圧縮としこれによる弾性板の歪みを変えて行うので、同時にバネ緩衝の役目をする。したがって(C)を介して伝達される振動は吸収される。送り量の調節は送り量調節ハンドルでフリクション、ホイールの回転比を変え、原動軸(A)の回転に対する軸(B)の回転を増減して弾性板の歪み量を加減する。ナイフと試料の位置を合わせる粗動は図の粗動装置のつまみを回転し、スクリューを介して弾性板全体をベースの上を滑動せしめる。超マイクロトームの駆動は手動、モートル駆動のいずれも行えるようにした。モートル駆動の際は回転把手をプーリとしてベルト伝導を行う。

(3) 弾性変形による送り機構

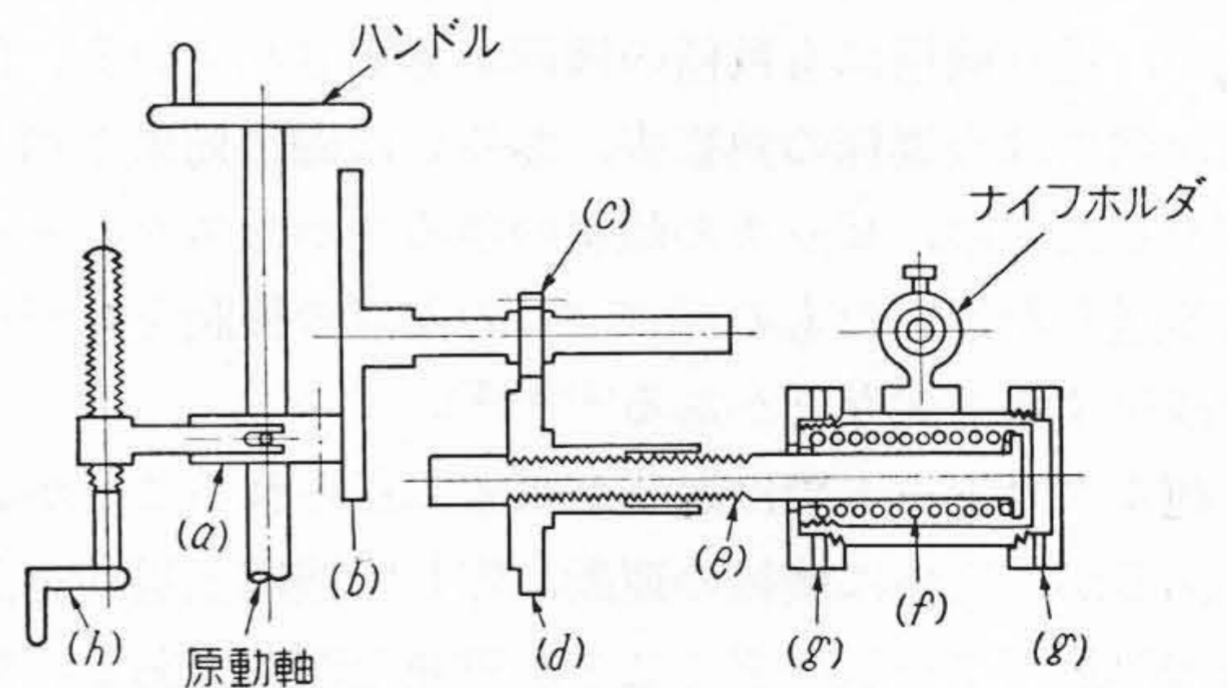
弾性板に対してはその中央部に剪断歪力に相当するような作用を生ずる形とし、つる巻バネの圧縮に対してこの歪が比例的に起るもので弾性履歴のない材質を用いた。第3図にその機構図を示す。すなわちハンドルの回転により原動軸が回転し、この軸方向に滑動できるように装着された摩擦車(a)を介して摩擦車(b)が回転し、この回転が歯車(c)を介して同じく(d)を回転する。(d)の中心にはスクリュー(e)が嵌合し、(d)の回転によって軸(e)は左右に移動し、軸の一端に装置されたつる巻きバネ(f)を圧縮して弾性板(g)に歪みを与える。摩擦車のスリップ防止のため、摩擦ローラ(a)の摩擦面(円周)は中央に牛皮をはさんで両側をファイバーとし、原動軸と同心に加工した。また(b)の摩擦面(円板)は#500砂による研磨を施して摩擦回転を確実ならしめた。(h)は送り調節用把手で、これで摩擦車(a)を移動させ



第1図 日立 UM-2型 超マイクロトーム配置図



第2図 日立 UM-2型 超マイクロトーム外観



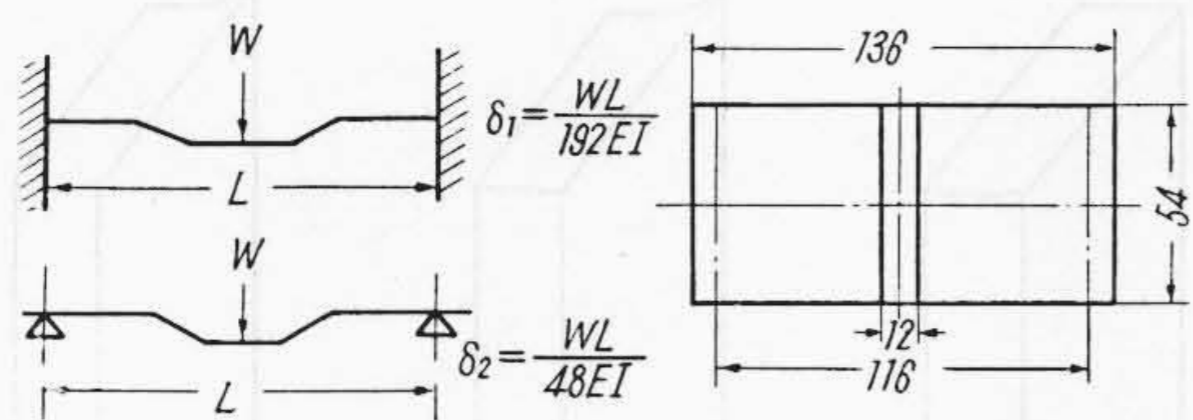
第3図 送り機構部

て(a)(b)の回転比を連続的に変化できる。

(A) 弾性変形機構の設計仕様

(a) 弾性板圧縮バネ(つる巻きバネ第3図の(f))  
材質はピアノ線を用い、次のようなものを用いた。

	使用状態で最も伸びた時	使用状態で最も縮んだ時	変形量
強さ(荷重)	約 0.31 kg	約 3 kg	2.69 kg
圧縮量*	2.5mm	24mm	51.2mm



S: 弾性板変形量 (cm)  $I = \frac{bh^3}{12}$   $b=5.4$  cm  
 W: 弾性板の荷重 (kg)  $W=3.75$  kg  
 L: 弾性板の長さ (cm)  
 I: 二次モーメント (cm<sup>4</sup>)  $\sigma_1=0.0096 \mu$   
 E: 弾性係数  $2.1 \times 10^6$  kg/cm<sup>2</sup>  $\sigma_2=0.038 \mu$

第4図 弾性板の変形量

圧縮率 8 mm/kg

\*ここで圧縮量とはバネの自然長から使用状態におけるバネの長さを差引いた値を示す。

(b) 摩擦車(a)(b)の回転比 1:4 (最大比すなわち送り最少)

直径比 30mm:120mm

(c) 弾性板の形状および変形量

弾性板の材質は種々実験の結果、軟鋼が弾性履歴も少なく<sup>(6)</sup>、直線性の送りを与えるのでこれを用いた。

形状は第4図に示されるようなもので厚さ3.2 mm、両端を弾性板受の取付部とし、中央12mmの幅に荷重をかける。この際弾性板にかかる荷重と歪との関係は、同図左に示されるような二つの場合が考えられる。UM-2では弾性板の端面をネジで取付け、締めつけてあるので実際には両方の形が総合されて掛つてくると考えられる。

弾性板にかかる圧縮バネの荷重3 kgとした時、ハンドル一回転についての弾性板の歪み $\delta$ を求めて見る。

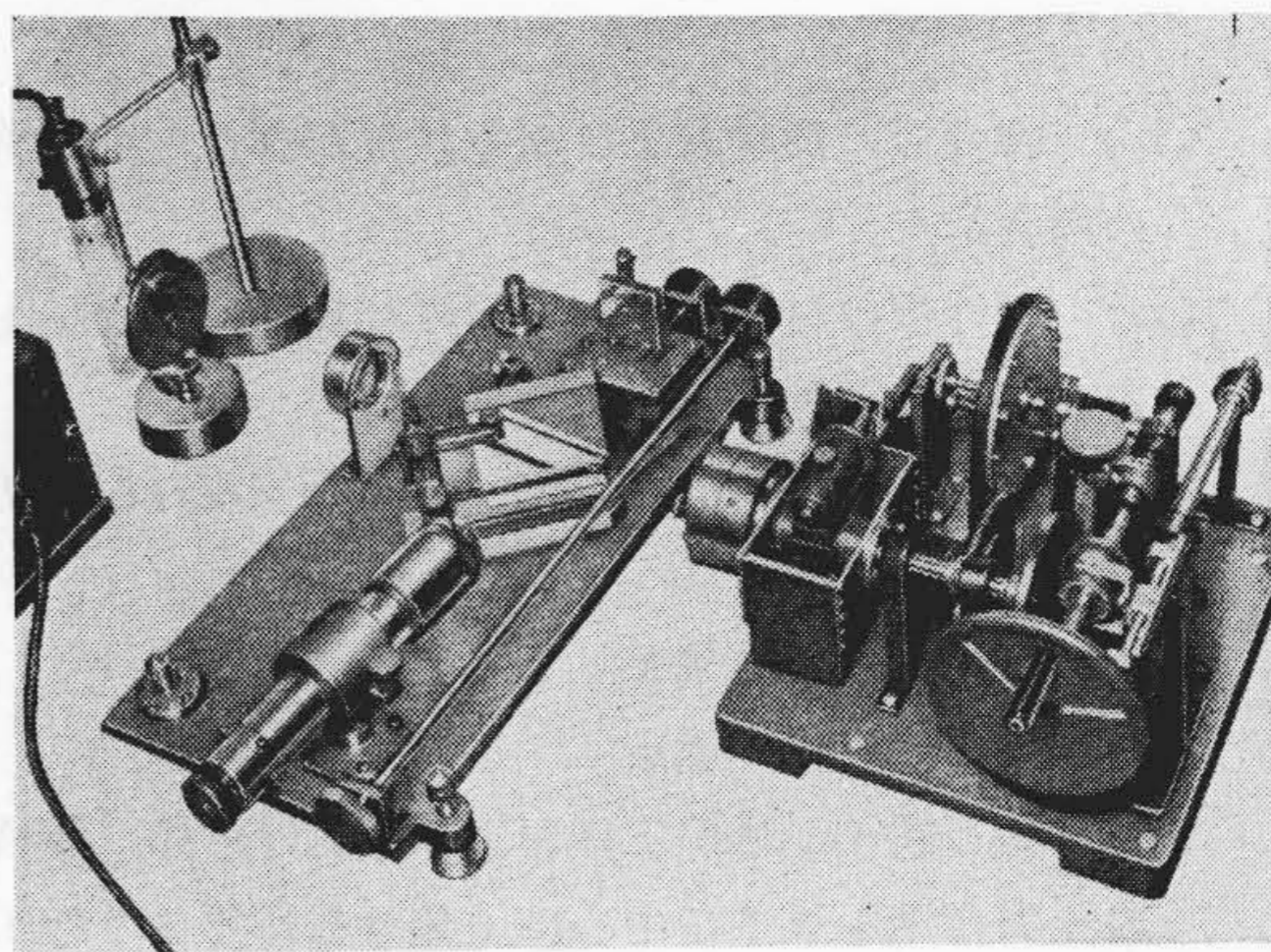
摩擦車の回転比、平歯車の歯数比から、バネ圧縮軸(e)は、把手一回転について0.03 mm移動する。

(A) (a) 項から圧縮バネの圧縮率は8 mm/kg、すなわち125 g/min。したがって弾性板にかかる荷重  $W=125 \text{ g} \times 0.03=3.75 \text{ g}$

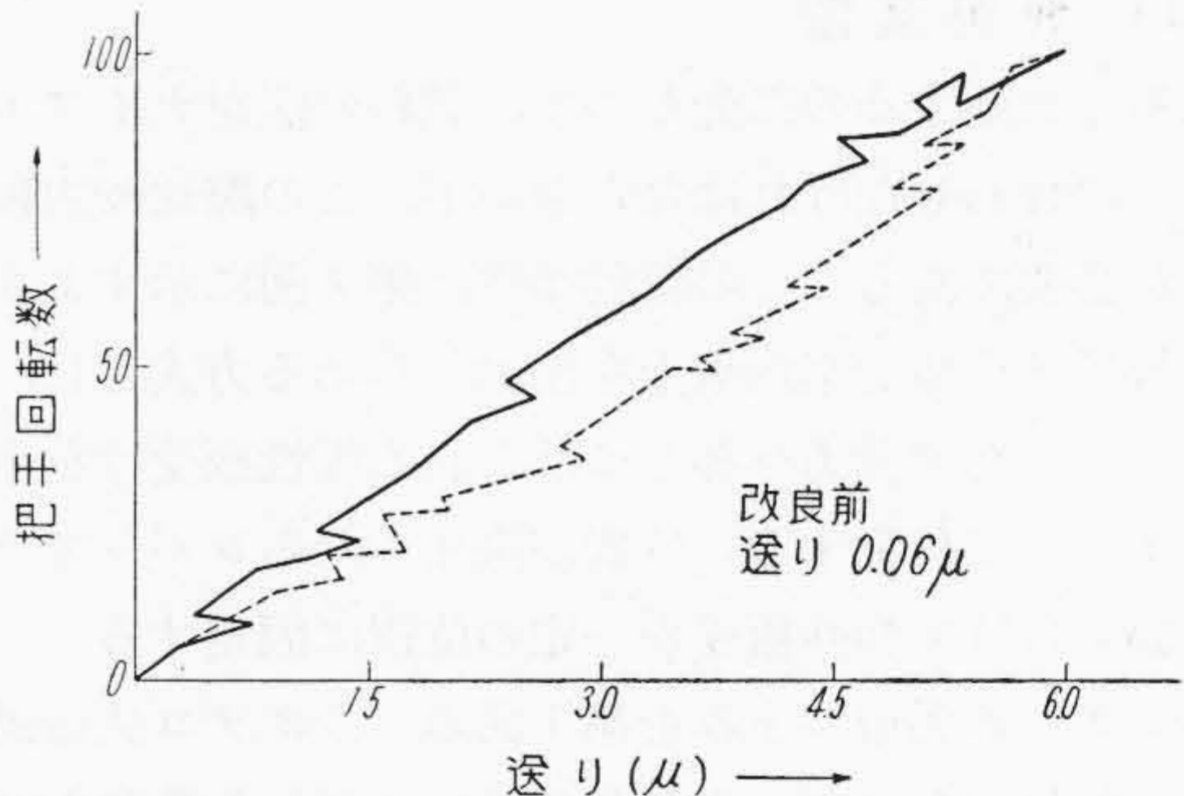
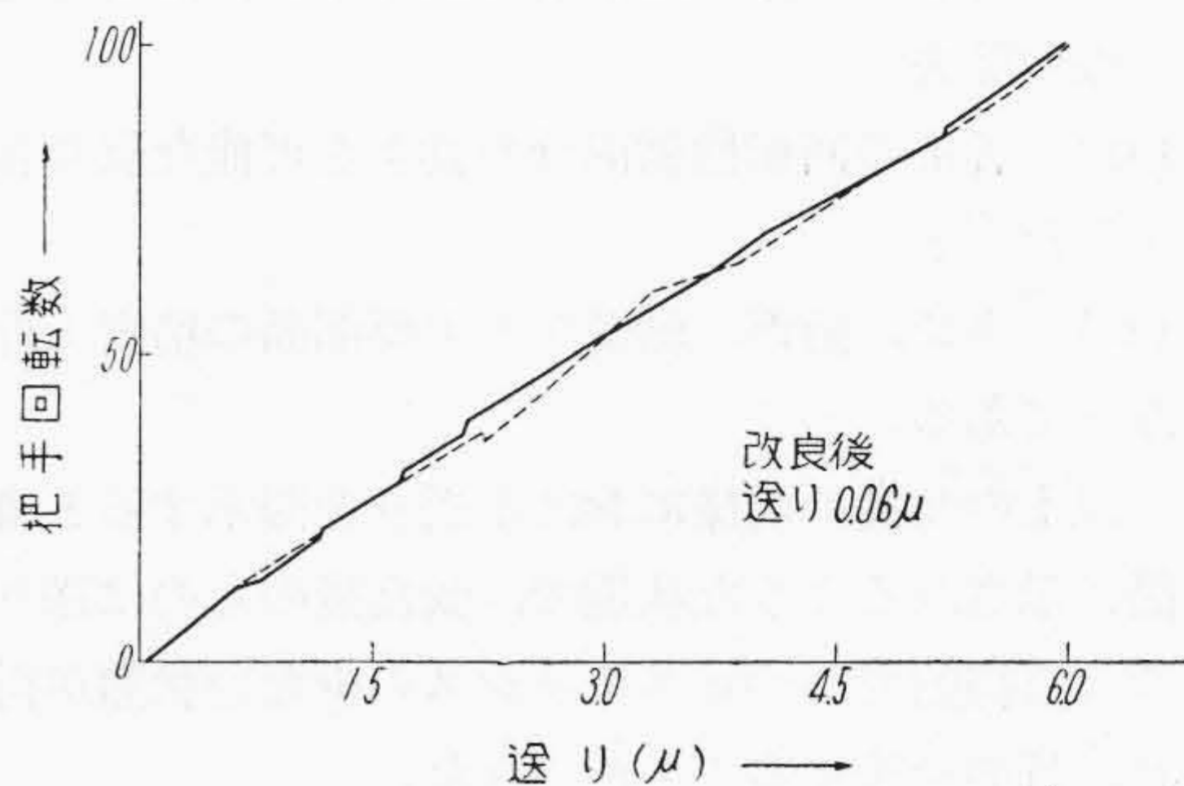
この値を図中の各式にあてはめて $\delta_1, \delta_2$ を求めるとおのおの0.0096  $\mu$ , 0.038  $\mu$ となる。これは弾性板一枚の歪みであつて、実際には二枚用いてあるからこの半分となる。実際切つた切片の厚さは、最少送りで0.01~0.03  $\mu$ と推定されるものが多いから、おおよそ計算値の範囲内に入つていられる。

(B) 送り量測定の実験

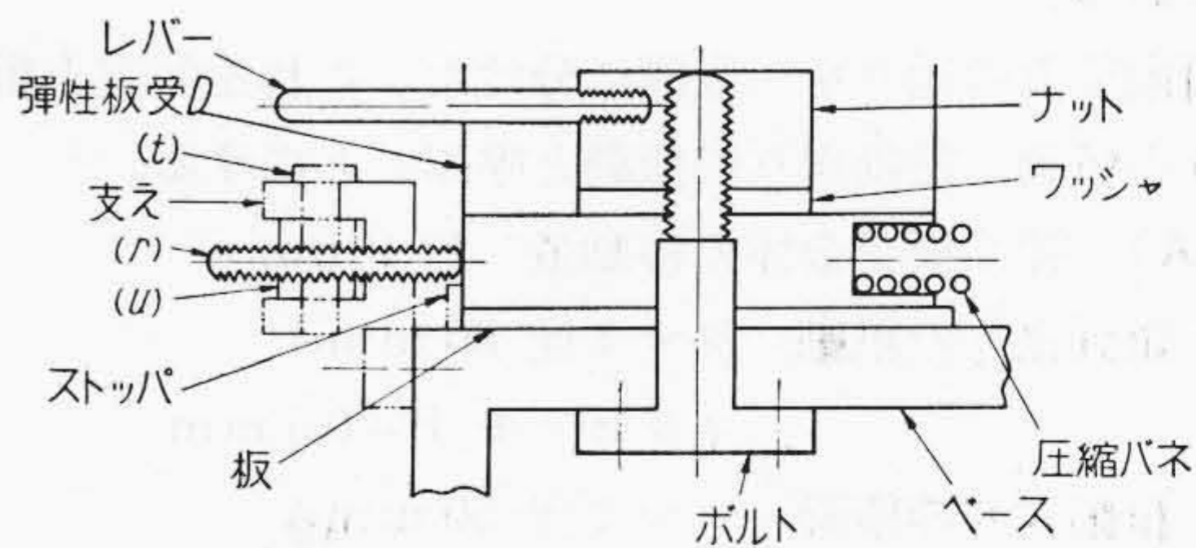
送り量の測定には第5図のようにマイケルソンの干渉計を用い、超マイクロームの送り装置に反射鏡を付して、測定を行つた。0.3  $\mu$ 幅の干渉縞の移動を



第5図 超マイクロームの送り測定



第6図 超マイクロームの送り測定値の一例



第7図 粗動およびナイフ位置固定装置

測微頭微鏡で読みとるのである。試作機の初期の実験では送りは必ずしも荷重対歪み量が直線的に送られず種々の障害を経験した。これらの障害および改良の結果を結論的に要約すれば次のとおりである。

(a) つる巻きバネの形状が中心に対して非対称の

場合

(b) 弾性板の形状および組立状況が弾性的非対称の場合

(c) 弾性板の材質によつて歪みが比例的でないものがあること

(d) 送り運動の軸受，圧縮バネが不安定な動き方をする場合

これらに対する対策としては

(a) 弾性板材料の選定

(b) つる巻きバネの工作および取付けの際，端面の圧力合力をコイル中心に一致せしめるような工夫

(c) 組立ての際，端面接触部のガタによる非対称性の除去

(d) 各部の回転摺動部分の動きを可能な限り軽くしたこと

(e) ネジ，歯車，軸受など主要部品の精密工作などである。

以上の改良の前後における送りを図示すると第6図に示されるような状態で，改良後のものは送りがほぼ直線的でかつヒステリシスの少ない状態が得られ，目的を達することができた。

(4) 粗動装置

試料を切断するのに先だつて，試料の面をナイフエッジの稜に合わせなければならないが，この際比較的粗い送りが必要である。この粗動機構は第7図に示すように弾性板受け全体を案内板上を滑動せしめる方式とし，圧縮バネでたえず前方へ押しつけられる弾性板受けをネジ(r)で押し移動する。位置が決まったらレバーでナットを締め付けて弾性板受を一定の位置に固定する。

この際，粗動用つまみを第1図のようにテコ式微動つまみを附属せしめて，送り量を $1/8$ に落した微動を行わせ，面合せを容易ならしめた。その設計仕様は次のとおりである。

粗動装置の送りを二段階に分けた。これを便宜上粗動送りの粗動，粗動送りの微動と呼ぶことにする。

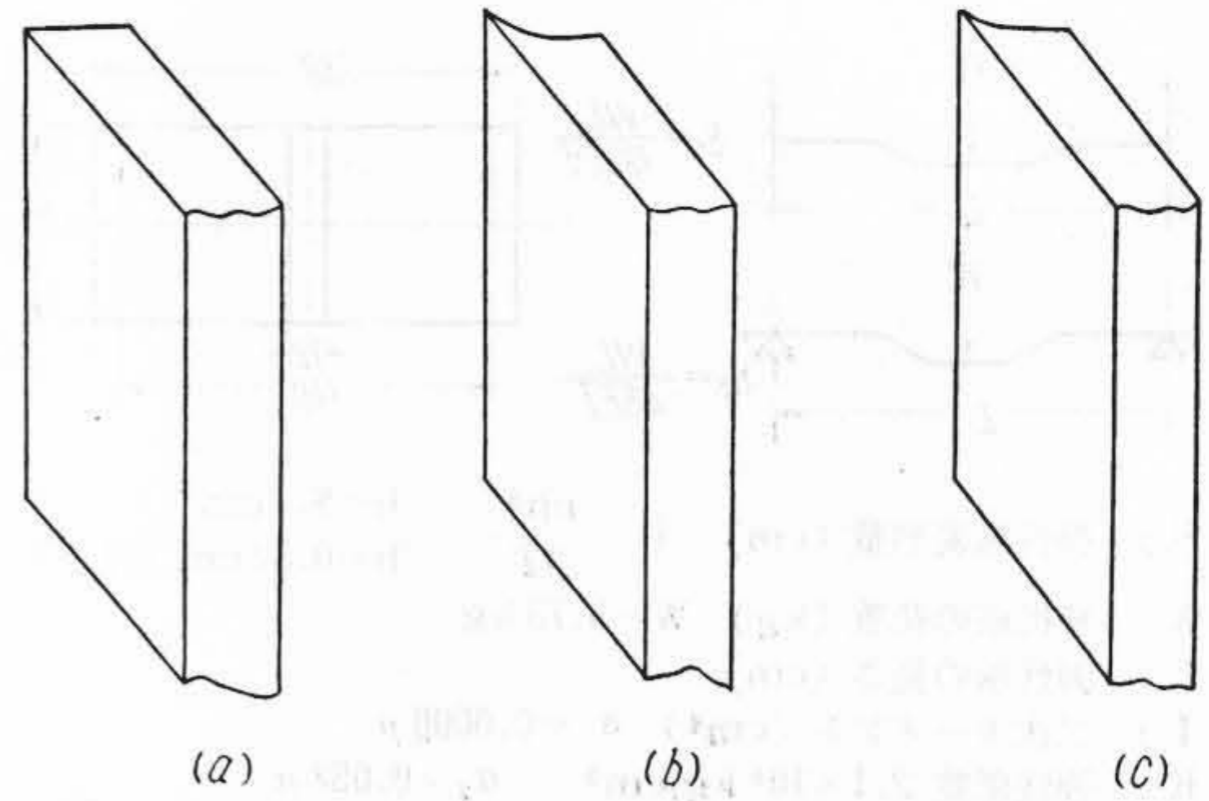
(A) 弾性板受全体の移動量 約4mm

粗動送りの粗動 ツマミ径 30mmφ  
ネジピッチ P=0.5mm

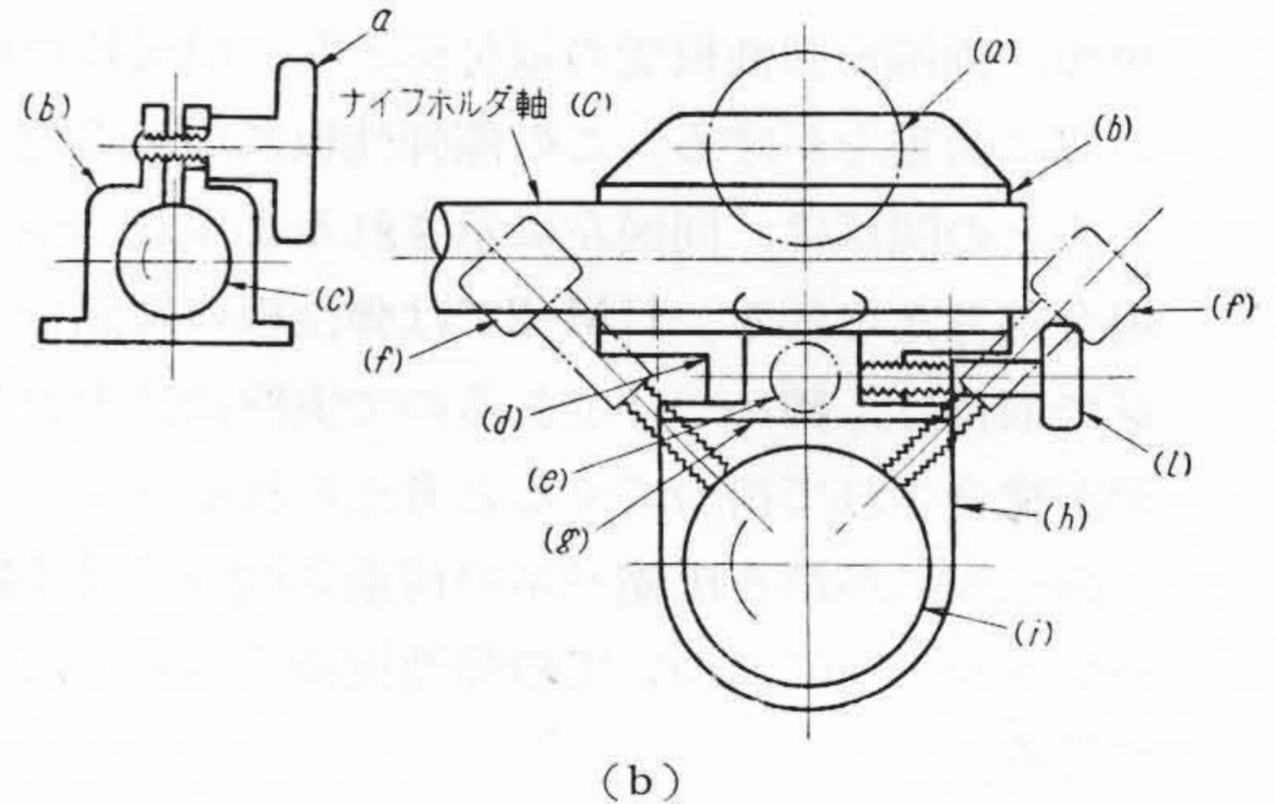
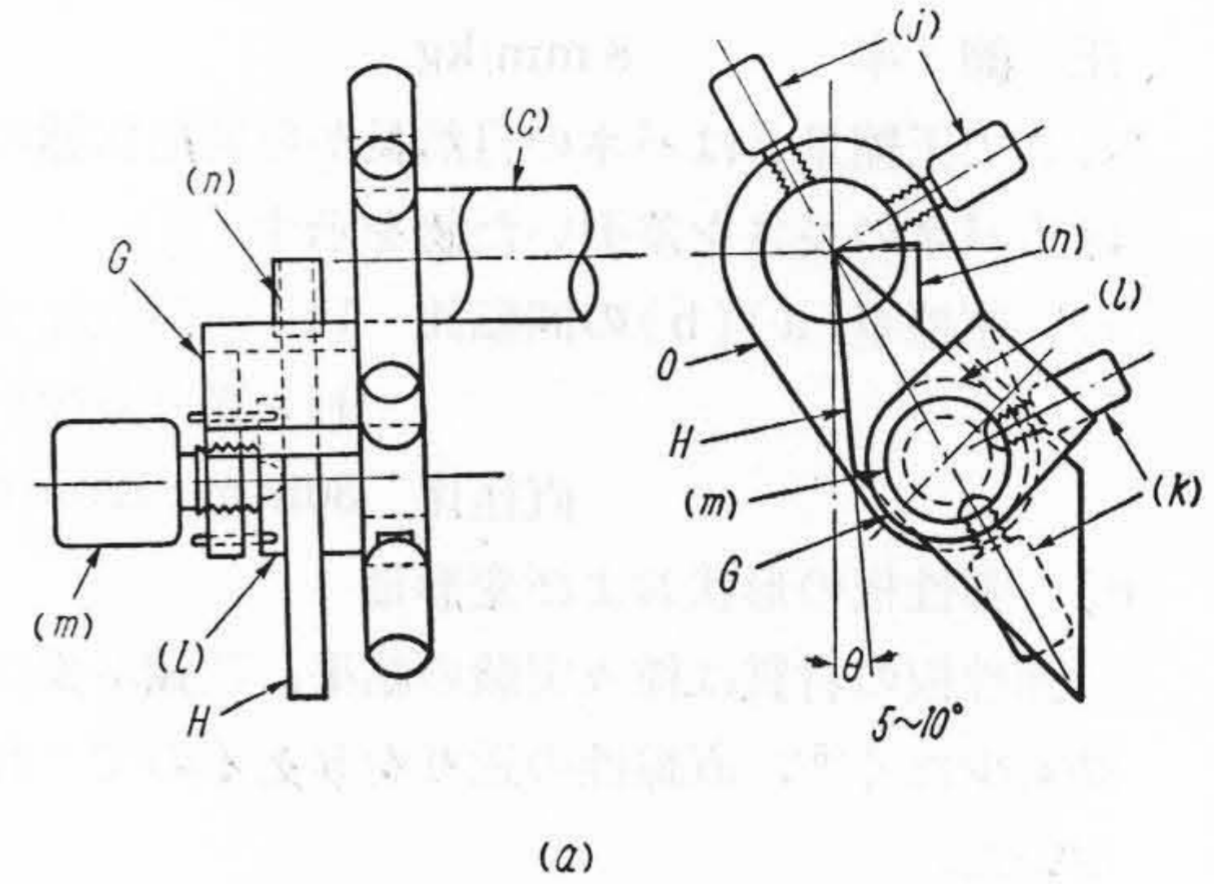
粗動送りの微動 ツマミ径 50mmφ  
ネジピッチ P=0.5mm

(B) 粗動の送り量

粗動送りの粗動の場合，ツマミ一回転について0.5mm移動させる。粗動の微動の場合は第1図のように，ピンを支点として両ツマミの距離を10mm，80mmとし，粗動送りの微動用ツマミ一回転で0.0625mm移動させ得るようにした。



第8図 ガラスナイフ



第9図 ナイフ保持装置(a)およびナイフ自在装置(b)

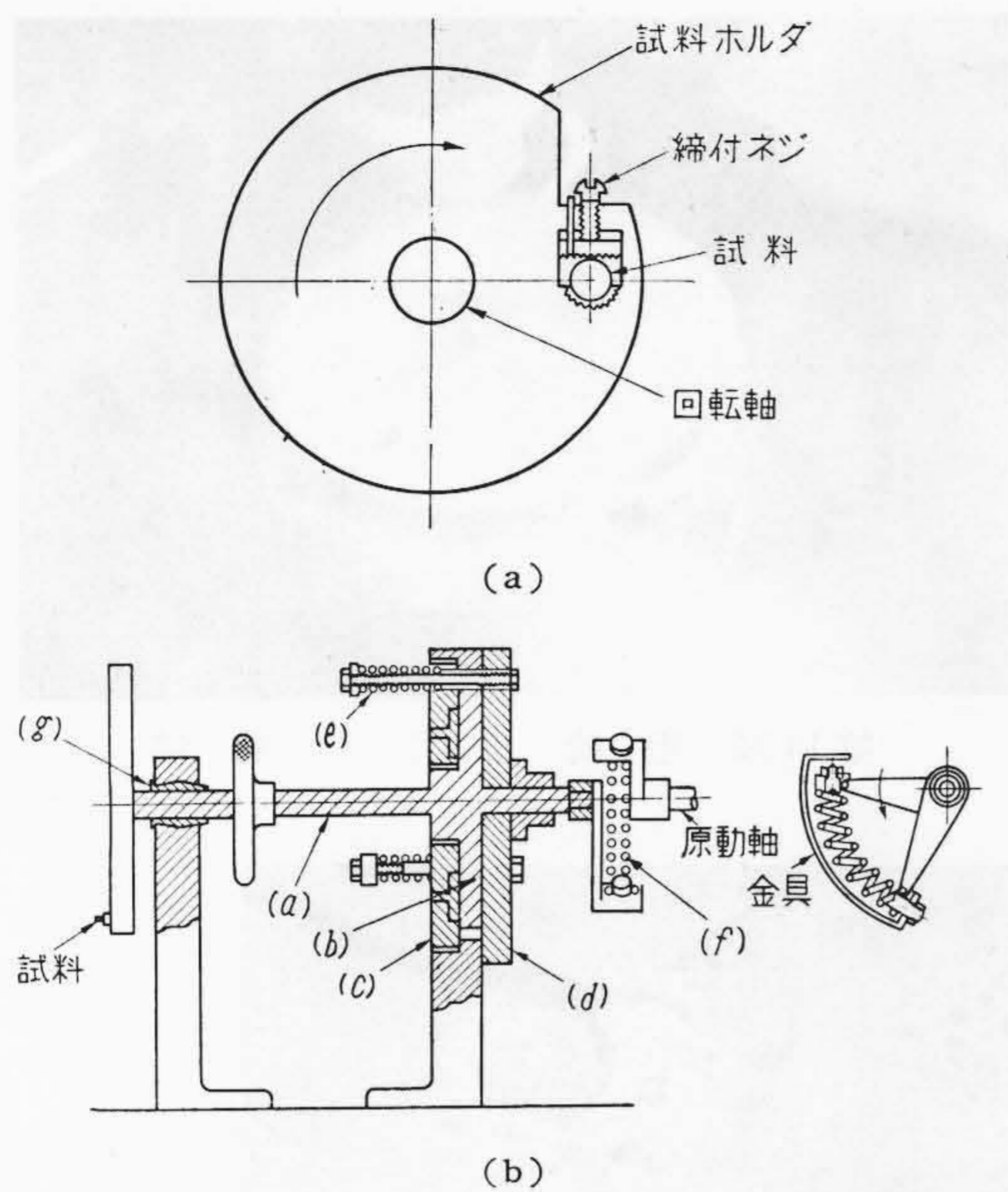
(C) 弾性板受圧縮バネ

弾性板受箱全体を常にツマミ第7図(r)の先のネジ端に接触させまるため，受箱全体を後方からバネで押す方式を用いたが，このバネは圧縮率1.5mm/kgのピアノ線つる巻きバネを用いた。

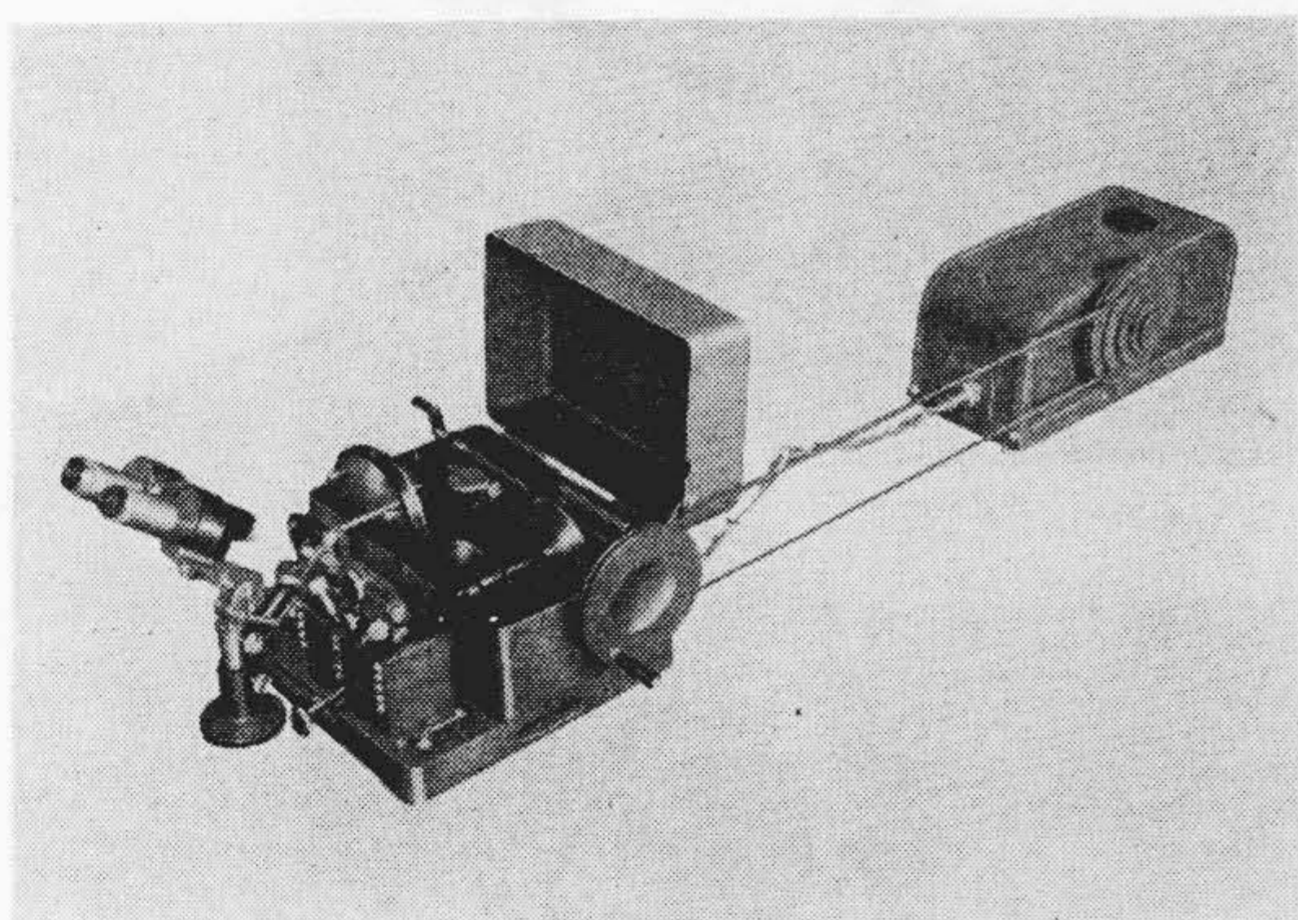
(5) ナイフ支持機構

現在超マイクローム用ナイフとして最も広く用いられ，また性能もすぐれているのは Latta-Hartman 型のガラスナイフで第8図に示されるような菱形のガラス片のエッジを用いるものである。UM-2型マイクロームには鋼製ナイフホルダも附したが，大多数の使用人はガラスナイフを用いるのでこれを中心として述べる。

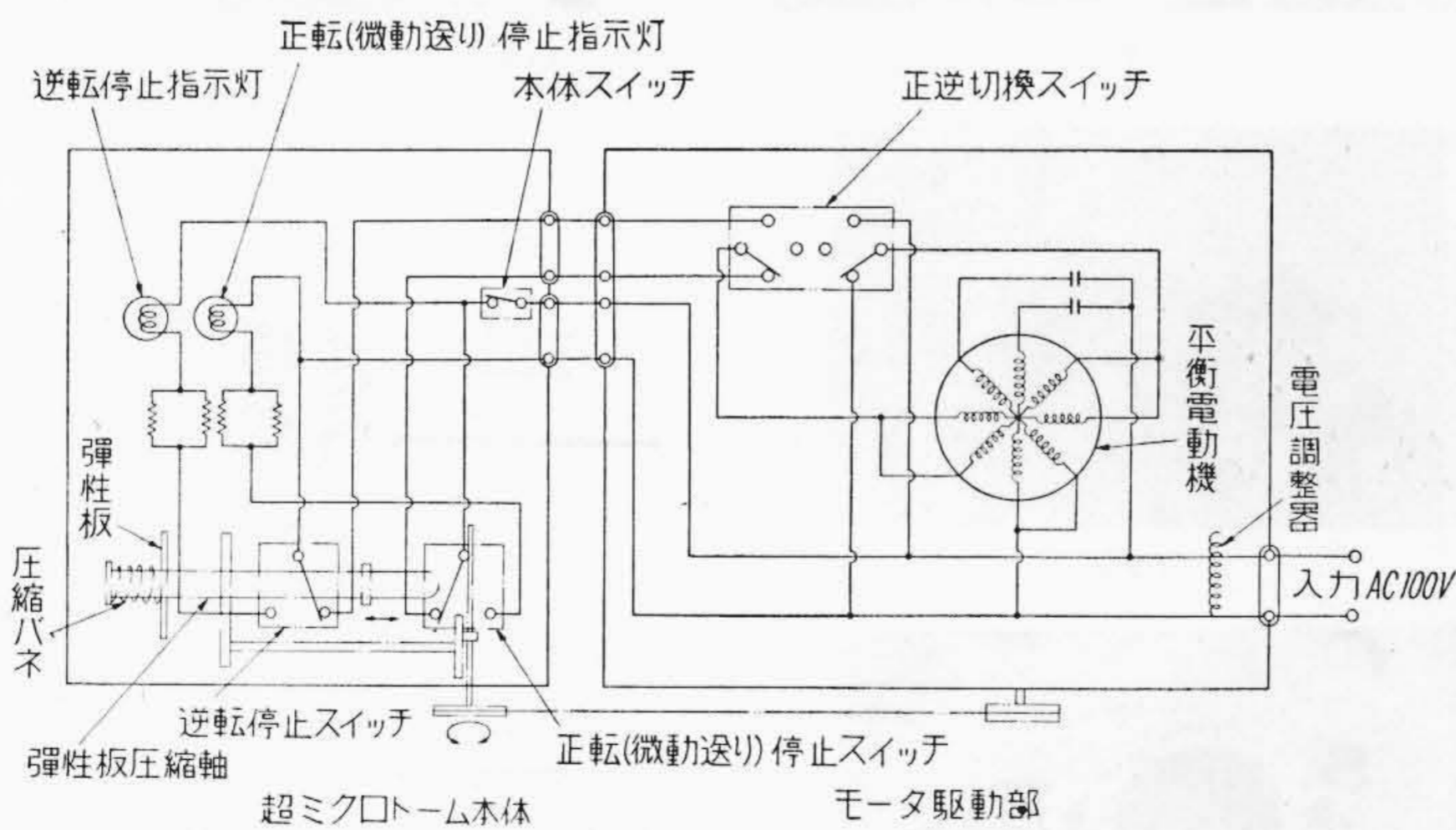
この菱形ガラスナイフは実験者が自製するのであるが，ナイフガラスエッジは必ずしも図の(a)のように



第10図 試料保持円板(a)および試料回転規正装置(b)



(A)



(B)

第11図 モートル駆動外観(A)およびモートル駆動超マイクローム配線図(B)

直線的に割れず、(b)(c)のように種々の形状に割れるのが普通である。しかし実際に使用するナイフエッジは1~2のmm長さに直線部が得られれば十分で、このガラスナイフを第9図(a)の(h)の位置に置いて用いる。

このガラスナイフホルダは弾性板受けの上に取り付けられ、第9図(a)(b)のように保持を行わしめた。

この際、割られたガラスナイフエッジの形状によつて必ずしもエッジと試料面が平行にならないので、ナイフを三方向に自在調節を行い得るように設計した。

つまり第9図(b)においてガラスナイフエッジの左右方向の位置はナイフホルダ軸(c)の左右移動によつて調節し、また(c)の回転によつてナイフの切断角を調節する。適当な調節位置が得られれば(a)を締めつけて用いる。さらに図の(e)をゆるめれば(b)(c)(d)が一体となつて(g)を中心として水平に回転し、また(f)をゆるめれば(b)(c)(d)(h)が一体となつて(i)を中心として上下に首を振つて回転する。なお(i)は弾性板に固着している。

以上のようにナイフエッジの形状にかかわらず、常にナイフエッジを試料に平行にとりつけることができる。

以上の機構のほか、第9図(a)においてナイフの取付けおよび切断角の微細調整可能な機構とした。すなわち(j)をゆるめることによつて(o)を回転し、(k)をゆるめることによつて(G)を回転する。

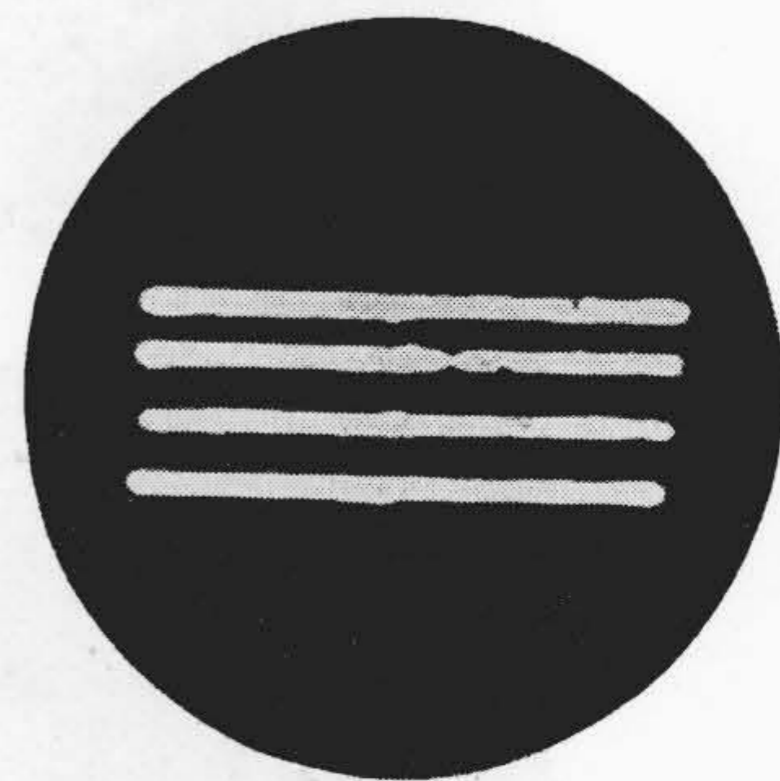
以上の諸調節によつて相当不規則な割れ方をしたガラスナイフも、良好なエッジを有する部分があれば、容易に試料に対して正しい位置に取り付けることができる。

(6) 試料回転機構部

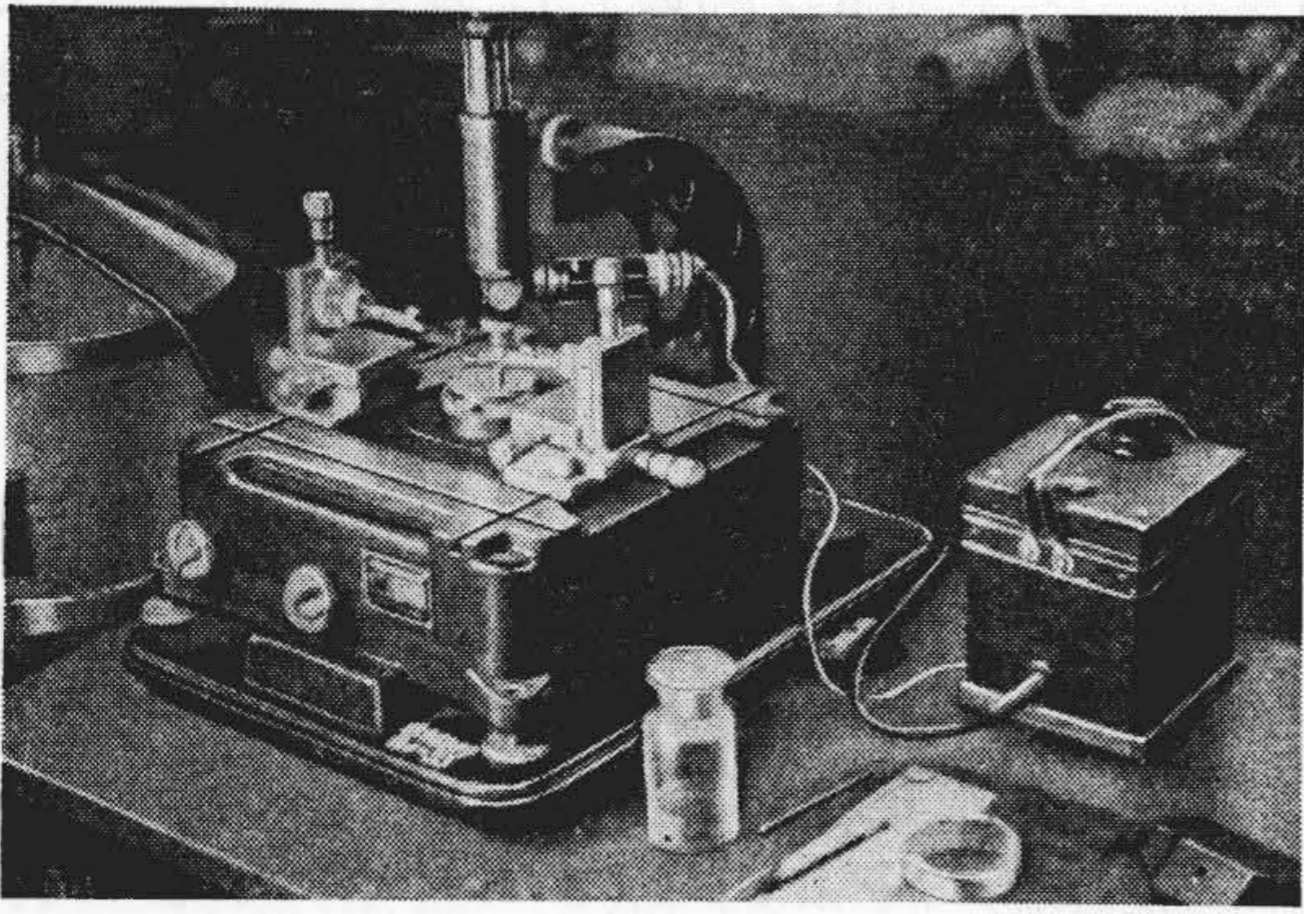
本マイクロームに在つては送り機構がナイフの前進によつて行われるので、試料の切断運動機構は送り機構と独立に設計しうる点が強味である。

試料は回転運動方式を採用し、回転時における試料位置の復元性を規正するため Watson の摺動機構<sup>(7)</sup>を採り入れ、第10図のような構造とした。

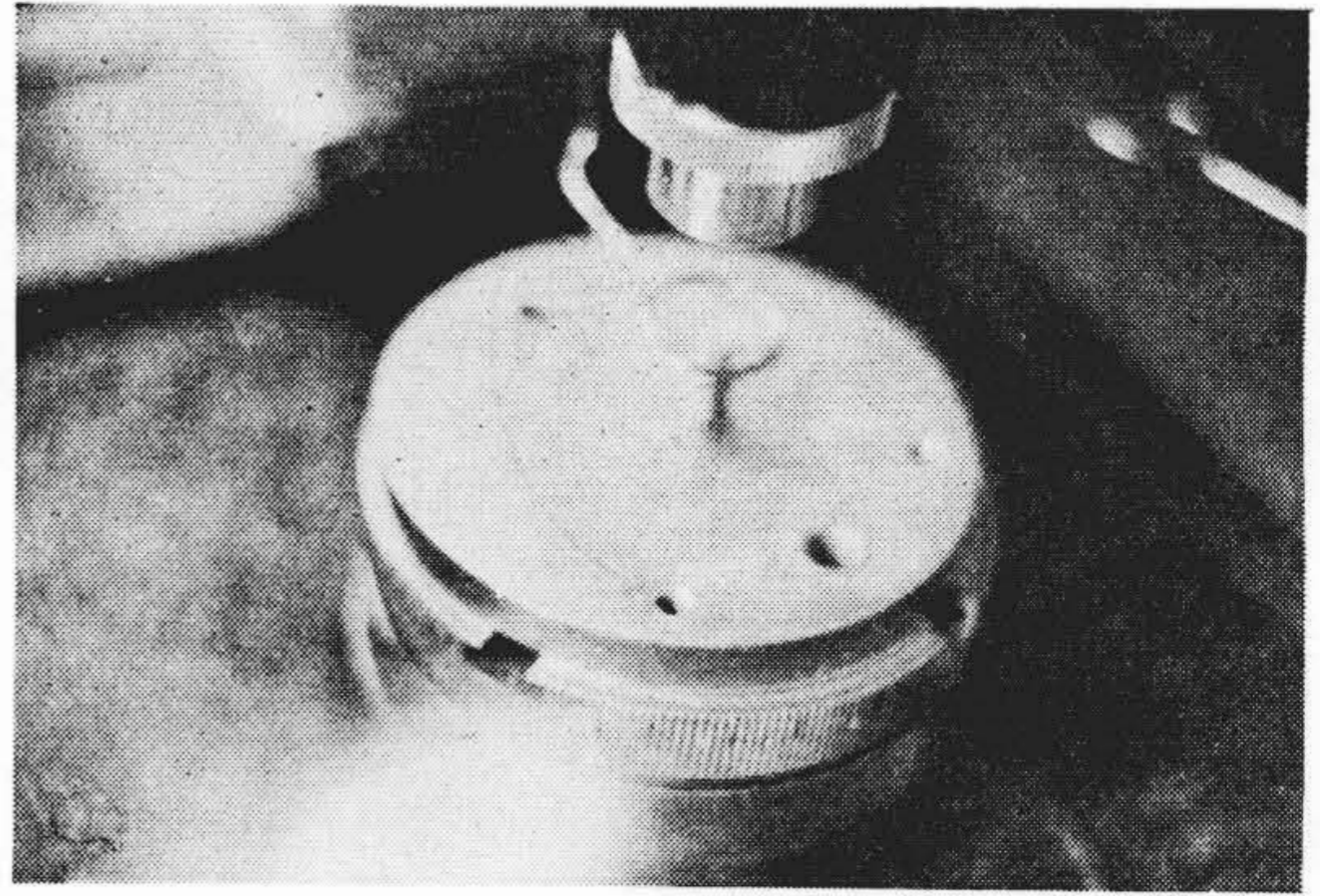
すなわち試料は回転軸(a)の一端に



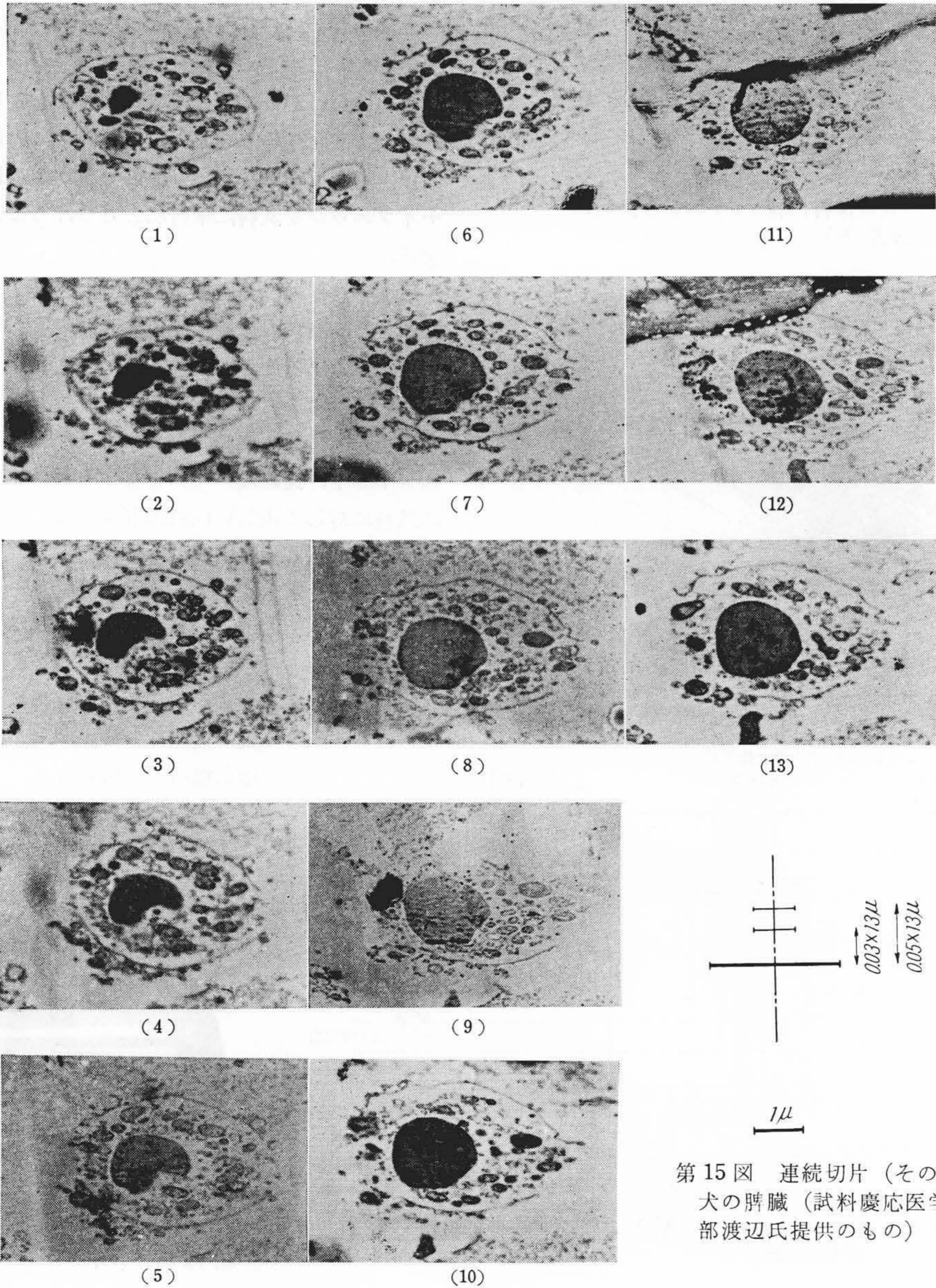
第12図 スリットメッシュ ×8



第13図 ミクロマニプレータ (顕微解剖機)



第14図 連続切片の載物



第15図 連続切片 (その1)  
犬の脾臓 (試料慶応医学  
部渡辺氏提供のもの)

試料保持円板を付して円運動を行わせ、回転軸(a)の運動を規正するため軸(a)と一体の円板(b)を二枚の摺合わせ板(c)(d)の間に挟み(b)(c)(d)の摺合わせ面は光学レンズ研磨機によつて高度に研磨し(ニュートリング3本程度)、3点においてバネ(e)によつて密着を維持せしめ、浮動を防止し、このように回転板(b)の回転精度を高めることによつて、これと同一運動を行う軸(a)の運動を規正したものである。回転把手の回転は原動軸に伝えられるのであるが、これを直接(a)軸に連結すると、原動軸、傘歯車の振動を軸(a)に及ぼすおそれがあるので両軸の連結をバネ(f)を介して行い、悪影響をこれに吸収せしめるようにした。(g)は球状軸受(ブッシュ)で軸(a)の試料端をささえ軸先端の曲げによる悪影響をのぞくためのものである。以上のような機構によつて試料の回転を常に同一軌跡を画くような平面運動を行わせるようにした。

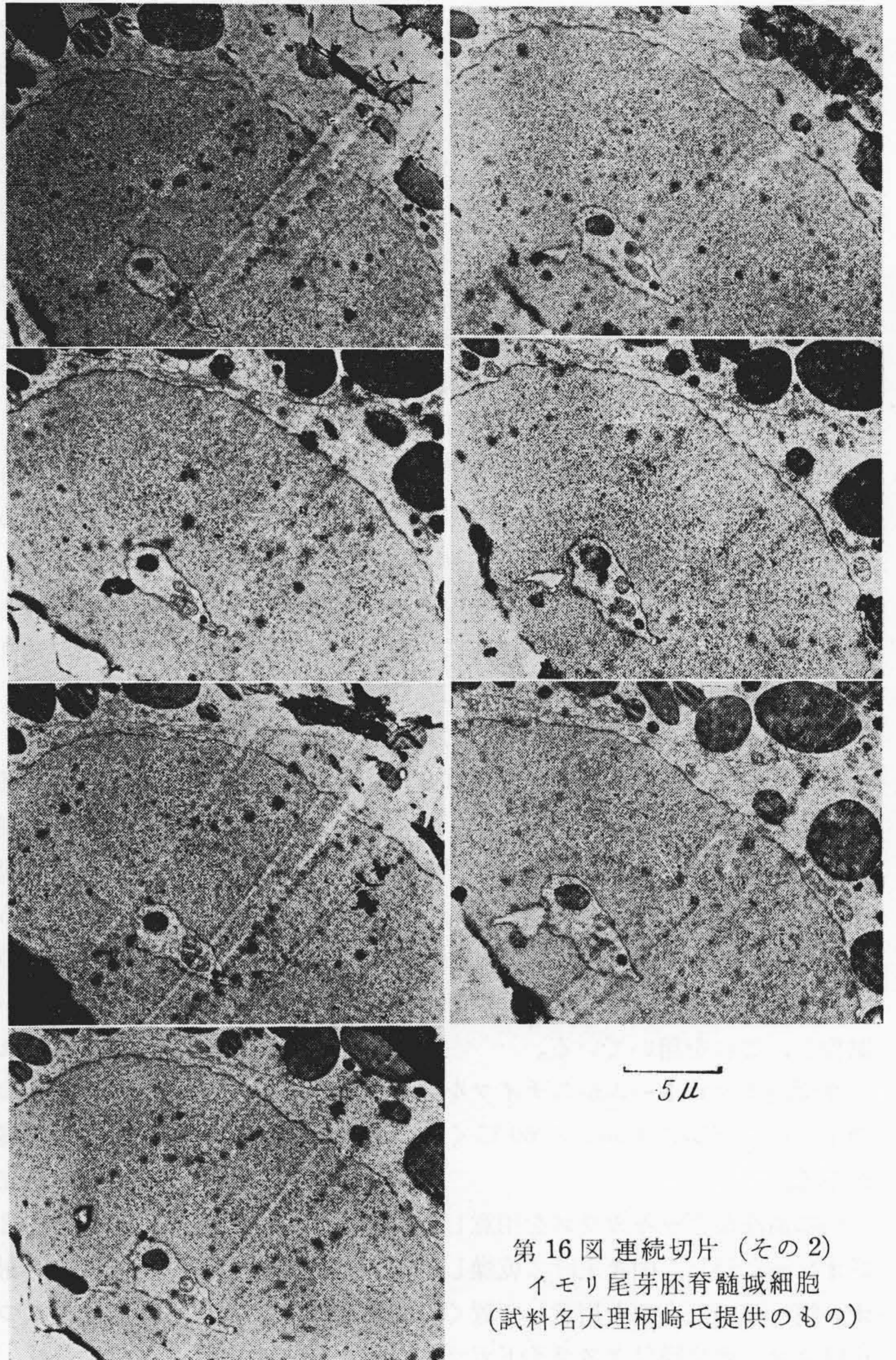
### 〔III〕 連続切片に関する 実験

細胞の微細構造の立体的復元に、光学顕微鏡切片でしばしば用いられた連続切片法は、最近電子顕微鏡においてもその必要性が痛感されるようになった。一方超マイクロトームの性能判定にあつて、連続切片は適切な実験方法であつて、その性能基準に大きな目安を与えるものであろう。

超マイクロトームの理想状態にあつては、一定の厚さの切片が、毎回の試料切断に際して確実に得られることであるが、UM-2型超マイクロトームでは $0.05\sim 0.03\mu$ 級の連続切片を容易に得られる性能を有することがわかつた。

連続切片に関する実験では、超マイクロトームの性能とともに実験条件を規正することが重要である。実験に当つて最も悪影響を及ぼしやすい因子は振動と、温度変化による機械の部分的熱膨脹である。このため実験室内および機械据付部の除振、試料部分の照明などに留意しなければならない。

連続切片法では超マイクロトームのモートル駆動が望ましい。手動の場合と比較して回転が均一で切片切断の連続性ははるかによい。モートルのプーリと、超マイクロトームの把手プーリを丸ベルトで結べばよい。第11図(A)



第16図 連続切片(その2)  
イモリ尾芽胚脊髄域細胞  
(試料名大理柄崎氏提供のもの)

にモートル駆動の場合の外観を示し(B)にその時の配線図を示す。弾性板の使用限界の両端をパイロットランプの点滅で明示し、モートルは機械の微動送りネジによつて自動的に止められモートルスピードは電調圧整器で加減できる。

切片照射用光源は光学顕微鏡用投光器を試料と30cmの距離に置いて、中間にビーカーまたは水を入れた水槽(厚さ約10cm)を透過せしめて熱線を吸収せしめるか、あるいは超小型蛍光灯(筆者などは4W蛍光灯用いた)を、切片受ボートの真上に置いて実験を行つた。切片リボンの観察には約50倍の双眼拡大鏡が便利である。連続切片ではガラスナイフエッジの直線部分以外は用いられない。

これは切られた切片リボンをまつすぐ並べないと、スリットメッシュにのせることができないためである。

ナイフには切片受ボートを附し、この中にオクチルア

ルコールの飽和水溶液を満たして切片を浮べた。

試料切断面は1 mm×0.1 mm くらいの矩形とし長辺をエッジと並行させて切断する<sup>(8)</sup>。切片の連続方向をできるだけ短かくしないと、スリットメッシュ上に連続切片が沢山並ばない。またナイフのエッジは試料に正しく平行にあてることが重要である。

試料は包埋剤を含むカプセルをそのまま、マイクロトームの試料ホルダに入れずに、カプセルを金属パイプの中にパラフィンで埋め込み、この金属パイプをホルダに取り付けて切断を行った。これは締付けによるプラスチックの弾性および塑性のため試料の前進方向への伸びを防ぐ目的である。切られてくる切片の厚さはマイクロトームの送りと、切片の干渉色から判断される。われわれの実験では大体銀白色切片のみで0.03~0.05 μと推定される。連続切片法では毎回の切断が確実に行われ、試料のストロークに対して切断の遊びがあつてはならない。これは試料とナイフエッジの擦過によつて試料面に損傷を生ずるためである。筆者の実験では200回の切断に対して平均95%の切断率を示した。

上記のポート内に切片リボンが浮んだら、これをスリットメッシュにのせるのであるがわれわれは次のように行つた。

スリットメッシュは第12図に示すようなスリッタを試作し、これを用いている。

まず超マイクロトームからナイフを静かに脱し、ポートの中に浮んだ切片リボンを60°C くらいの温湯中に移しかえる。

別に清浄なデッキガラスを用意し、これを0.5% コロジオン液に浸し、引き上げて乾燥しガラス面上にコロジオン膜を張つたものを用意して置く。温湯上に浮んだ切片はコロジオン膜付きスライドガラスに張りつけて乾燥する。このデッキガラスに切片が張りついた側のコロジオン膜にかみそりの刃で傷を入れ、これを水中に入れてコロジオン膜を水面に浮べて剥す。これを径10 mmのループの中央に切片がくるようにすくい上げて乾燥し、このループを第13図のマイクロマニプレータを用いて、顕微鏡で観察しながら、電子顕微鏡用試料支持台上のスリッタのスリット方向と切片リボンの方向をよく合わせながら位置を決め、ループを静かに降して、切片の張りついたコロジオン膜をスリッタに密着せしめる(第14図)。ついで針先を醋酸アミルに浸して周囲のコロジオン膜を切り取り、キャップを試料ホルダにかぶせて検鏡を行なうのである。

第14図および第16図にわれわれの観察例の一例を示した。試料はいずれも1%オスミウム酸、アセテート、ペロナール緩衝液 pH 7.4による固定、ブチルメタクリル、メチルメタクリル 3:7の共重合体に包埋したもの

で、試料は慶応大学および名古屋大学から御分与いただいたものである。

第15図は犬の脾臓細胞の連続切片で、送り0.03 μで切片を作つた。核の径の変遷がよく表われた一例でNo.1からNo.13に至る間、核は次第に径が肥大し、途中凹陷状断面を経て最大径を有する断面を示す。この径の変化と厚さの変化の関係を写真の右下に示した。核の最大径を太線で示すと1枚の切片の平均厚さを0.03 μにすれば、No.1の写真における最小径は太線に近い方の実線で示され、平均厚さを0.05 μとすれば外側の実線で示される。これらの断面の径比率から核がほぼ球形に近い形をしていることが予想され、また切片の連続性を証明できよう。

第15図はイモリ尾芽胚脊髄域細胞の連続切片の観察例で、送り0.02 μで切片を作つたものである。

#### [IV] 結 言

UM-2型超マイクロトームの機構上の特長について記し、その実験結果を要約した。超マイクロトームでは送りが正しく送られると同時に機械の運転中に生ずる誤差を消去しうるような機構を持つことが重要である。超マイクロトームの設計および実験に当つて、筆者らはこの点に重点を置いて研究を進めたが、試作機において満足な結果が得られたのでこれを商品化に移した。

性能試験例として、連続切片に関する実験例について記し、観察例を示した。

試作研究にあつて御指導をいただいた阪大田中氏をはじめ、日立製作所中央研究所および多賀工場の関係者各位に感謝する。

試料について御配慮下さつた慶応大学医学部渡辺陽之輔助教、名古屋大学理学部柄崎氏に御礼申上げる。

#### 参 考 文 献

- (1) D. C. Pease & R. F. Baker: Science 109, 8 (1949)  
Proc. Soc. Exp. Biol & Med. 67, 470 (1948)
- (2) J. Hillier & M. E. Gettner: J. App. Phys. 21, 889 (1951)
- (3) S. B. Newman et al.: J. Res. Nat. Bure. Stand 43, 183 (1949)
- (4) Philips Ultra Microtome Catalogue
- (5) K. R. Porter & J. Blum: Anat. Rec. 117, 685 (1953)
- (6) I. Kuroha, T. Sakurai & H. Tsuchikura: J. Electronmicroscopy 1, 46 (1953)
- (7) M. L. Watson: Quart. Tech. Rep. Univ. Rochester Atom. Energy Proj. UR-205 (1952)
- (8) R. C. Williams & F. Kahlman: J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 301 (1955)