

過マンガン酸カリ固定によるラット 精巢の電子顕微鏡的研究

東京女子医科大学解剖学教室 (主任 久保田くら教授)

助教授 串 田 つ ゆ 香
クシ タ

(受付 昭和37年6月5日)

I. 緒 言

電子顕微鏡の固定法については、多くの未解決な問題が残されている。従来、中性ホルマリン、Champany 氏液、Rugaud氏液および過マンガン酸カリ溶液などによる固定法が試みられたが、いずれも薄切が困難なことなどの理由から、現在ではほとんど用いられず、もつばら1~2%の中性オスミウム酸が用いられている。オスミウム酸が細胞内の蛋白成分を固定する上に、すぐれた固定剤であることはいうまでもないが、細胞の超微細構造の研究においては一般細胞学と同様に、いろいろの固定剤を使用し、比較観察する必要がある。一方電子顕微鏡的包埋法は、最近めざましい進歩をとげたため、将来は固定法の範囲も、広がることが考えられる。

過マンガン酸カリは電子顕微鏡切片の染色に、しばしば用いられているが、動物細胞の固定剤としては、Luft¹⁾、Mollenhauer²⁾らによる報告があるのみである。Luft は過マンガン酸カリの0.6%溶液を使用しているが、このような低濃度では膨化現象が強いため、さらに高い濃度が適切である。著者は Mollenhauer らと同じく3%溶液を使用した結果、ラット精巢について鮮明なる像を得たため、オスミウム酸固定との比較を行なった。

II. 材料および研究方法

実験材料としては6カ月を経過し、充分成熟したと思われるラットを使用した。材料採取はできるだけ迅速に、低温下にて行ないpH 7.4の3%過マンガン酸カリ酢酸緩衝液中に2時間固定した。以後型のごとく脱水、包埋後、薄切し電子顕微鏡にて観察した。なお包埋剤はメタクリル樹脂にジニールベンゼンを作用せしめ、三次元構造³⁾としたものを使用した。一般に過マンガン酸カリ固定を行なった組織片は、きわめて脆弱であり、包埋後の薄切も、はなはだ困難である。最近の三次元樹脂による包埋法を利用することにより、過マンガン酸カリ固定の場合でも薄切を容易ならしめ、かつ細胞の崩壊を幾分防ぐことができる。

III. 観 察

過マンガン酸カリ固定を行なった細胞の特徴は、いわゆる膜様構造が、きわめてよく固定されることである。たとえば精細胞における核膜、細胞膜、Golgi 装置および糸粒体などの線構造が鮮明であり、明確なる二重膜構造を呈している。このさい、多くは内膜の方が電子密度が大である。おのおのの細胞膜および核膜は凹凸が強く、多くの連続を欠いた部分を認める。オスミウム酸固定における細胞膜や核膜は、ほとんど平滑であり、また変形像も認められないことから推して、一種

Tsuyuka KUSHIDA (Department of Anatomy, Tokyo Women's Medical College): Electronmicroscopic observations on rat testes fixed in potassium permanganate.

の人工産物と考えたほうが妥当であろう。しかし精細胞間の不連続部は細胞間結合を示す部分に相当する。核および細胞の基質は、一般に均質性で、核小体は不明瞭で認められない場合が多い。精細胞質内に認められる膜様構造は、本固定では極めて発達し、丁度オスミウム酸固定における滑面小胞体に相当する部分である。従来精細胞内の小胞体は、一般に発育が弱いと考えられたが、最近の三次元樹脂包埋により、組織の収縮を防ぐために、かなり発達した像がみとめられる。過マンガン酸カリ固定を行なった場合、小胞体に相当する部分は管状構造を呈し、しばしば核膜および細胞膜と連絡している。精祖細胞では、比較的発達が弱い、精母細胞および精子細胞においては、きわめて発達し、ことに精子細胞質内では胞状を呈するが多い。また支持細胞においては、管状を呈する小胞体が、著しい発達を示し、しばしば層板構造を認める。オスミウム酸固定を行なった場合、精細胞内の小胞体は、ほとんど滑面小胞体に属する構造であるが、支持細胞では、多くは Palade 顆粒を含むいわゆる粗面小胞体の像を示している。

なお精細胞において過マンガン酸カリ固定の特徴は、糸粒体像が極めて鮮明に認められることである。精細胞の糸粒体は、pH 7.4 のオスミウム酸緩衝液に固定した場合は、 0.8μ 程度のおおむね一定した円形体であるが、精細胞の成熟状態により、その配列状態および内部構造において特徴ある所見を呈する。一方過マンガン酸カリ固定では、糸粒体は特に膨化し、直径 $0.9\sim 1.2\mu$ の円形像として認められる。精祖細胞の糸粒体は、直径 1.2μ の大なる円形断面を示し、比較的少数で、 $1\sim$ 数個が核の周辺部に認められる。内部櫛も規則正しい配列を示すが短かく、基質が多い(第1図)。糸粒体基質と細胞質との電子密度は、ほとんど同じであるか、または糸粒体基質の方がやゝ高いかである。精母細胞における糸粒体は、比較的多数存在し、直径 0.9μ 程度の杆状または円形体で、細胞質全体に散在している。内部櫛は発達し、複雑なる構造を示している(第2図)。成熟前期の精子細胞の糸粒体は、多くは細胞膜に接して存在

し、オスミウム酸固定においては空胞状を呈するが、本固定では比較的短い櫛構造を明瞭に認めることができる(第4図)。支持細胞の糸粒体は、より膨化し、精細胞のもの約2倍の大きさである。内部櫛も短かく、限界膜周辺から極めて規則正しい配列をもつて基質内に突出する。しばしば小管状構造を呈する(第1図、第2図)。したがって、いわゆる精細胞と支持細胞とは過マンガン酸カリ固定を行なった場合は、糸粒体の構造のみを見ても、容易に識別することができる。その他支持細胞内には直径 1μ 程度の電子密度大なる円形体を認め、糸粒体と密接している。

精子細胞内の Golgi 装置は、常に定型的構造を呈しているが、ことに過マンガン酸カリ固定においてはきわめて鮮明なる像を示す(第3図、第4図)。Golgi 膜はしばしば胞状の小胞体に移行している(第4図)。なお Golgi 膜の一端が屈曲し、断裂して、あたかも糸粒体が形成されるがごとき像も認められる。精祖細胞および精母細胞においては Golgi 装置はみとめ難いが、稀に Golgi 膜のみより成る発達の悪い像をみとめる場合がある。精細胞間の境界は、極めて明確な細胞膜により境界されているが、ところどころに連続を欠いた部分を認める。支持細胞間の境界は特異で、丁度層板状の滑面小胞体と類似した構造をもっている。おそらく desmosome に相当する部分と思われる。

IV. 考 案

動物組織の固定剤としては、オスミウム酸が生体に最も近い像を示し、すぐれていることはいうまでもない。ことに電子顕微鏡的観察では光学顕微鏡では観られなかつた人工産物が敏感にみとめられるために、固定剤も限定されるわけである。すなわち電子顕微鏡的固定剤の諸条件としては薄切し易いこと、微細構造がよく保存されることおよび或る程度の contrast が得られることなどである。過マンガン酸カリ固定は、薄切が困難であるが、三次元樹脂による包埋法を利用することにより、その困難さをやゝ軽減し得る。ことにオスミウム酸は主として蛋白成分を固定するのに対し

過マンガン酸カリはいわゆる糖類を固定するため、超微細構造観察の上に、意義あることと思う。過マンガン酸カリ固定は、最初 Luft¹⁾ により行なわれたが、0.6%溶液でメタクリル樹脂包埋を行なつたため、より特徴ある所見を得ることは不可能であつた。過マンガン酸カリ固定は濃度が上昇する程、組織に対する膨化現象が少ないため、2~3%が適当と思われる。しかし濃度が高いと組織はより脆くなり、薄切に際し破壊するおそれがある。著者は、これらの点を考慮し、Mollenhauer²⁾ らの方法を用いた。さらに薄切を容易ならしめるために、三次元構造のメタクリル樹脂³⁾ を使用した。

過マンガン酸カリ固定は、細胞の膜様構造が、殊によく固定されるため、細胞膜、核膜および糸粒体膜などが、きわめて鮮明である。一般に三層構造のうち、内層の方が電子密度大である。過マンガン酸カリ固定を行なつた精巢組織の電顕像に関しては、Zebrun⁵⁾ や Mollenhauer⁶⁾ による報告がある。いずれもその細胞内小器官についての特徴ある所見であるが、著者はラット精巢について、さらに詳細なる知見を得たので報告した。精細胞の糸粒体は、各段階の精細胞により、その内部構造、量および配列状態などに特徴を示していることは、既に報告した⁷⁾。過マンガン酸カリ固定の糸粒体は特異的で、やゝ膨化状態を示し、内部構造を一層鮮明に表わしている。ことに支持細胞の糸粒体は、著しく膨大し、内部構造も小管状を示し、きわめて特徴ある所見を呈している。したがつて支持細胞は過マンガン酸カリ固定を行なつた場合には、糸粒体像のみでも容易に識別することができる。光学顕微鏡的に支持細胞は、核膜の陥入、核小体および細胞質内の脂質顆粒などの特徴がみられたが、電子顕微鏡的には、細胞境界部の desmosome、細胞質の電子密度および円形体などに特徴があり、これらの所見は過マンガン酸カリ固定により一層明瞭とな

る。また Golgi 装置および小胞体は、本固定ではきわめて鮮明な像を示す。したがつて Golgi 胞と小胞体および核膜との移行像を明瞭に観察することができる。また糸粒体も Golgi 胞から移行するがごとき所見に接することができた。小胞体は、オスミウム酸固定の場合とは異なる形状を示し、多くは胞状で、かなり発達した像が認められる。ことに支持細胞では、しばしば層板を形成し、細胞膜と接している。

V. 結 論

ラット精巢組織を3%過マンガン酸カリ溶液にて2時間固定後、三次元構造のメタクリル樹脂包埋を試み、次のような特徴ある電顕像を認めることができた。すなわちオスミウム酸固定では不明瞭な細胞内の膜様構造がきわめて鮮明に検出され、糸粒体はやゝ膨化せるも特徴ある所見を得ることができた。したがつてオスミウム酸固定では理解し難かつた Golgi 装置、小胞体、核膜および細胞膜などの関係が、きわめて鮮明に観察された。また本固定を用うることにより、いわゆる精細胞と支持細胞とは糸粒体および小胞体像のみからも容易に識別し得る。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた久保田くら教授に深甚の謝意を表します。

(本論文の要旨は、日本解剖学会第22回関東地方会(昭和36. 5. 13)において発表した。)

文 献

- 1) Luft, J.H.: J. Biophys Biochem Cytol, 2 799 (1956)
- 2) Mollenhauer, H.H.: J Biophys Biochem Cytol, 6 481 (1959)
- 3) Kushida, H.: J Electronmicroscopy, 10
- 4) 串田つゆ香: 東女医大誌 28 232 (1958)
- 5) Zebrun, W. and Mollenhauer, H.H.: J Biophys Biochem Cytol, 7 311 (1960)
- 6) Mollenhauer, H.H. and Zebrun, W.: J Biophys Biochem Cytol, 8 761 (1960)
- 7) Kakinuma, T., Abe, H. and Nomura, Y.: Okajima Folia Anat Jap, 27 97 (1955)

付 図 説 明

過マンガン酸カリ固定による成熟ラット精巣組織の電子顕微鏡像。いずれも3次元構造のメタクリル樹脂包埋を行なったもの。

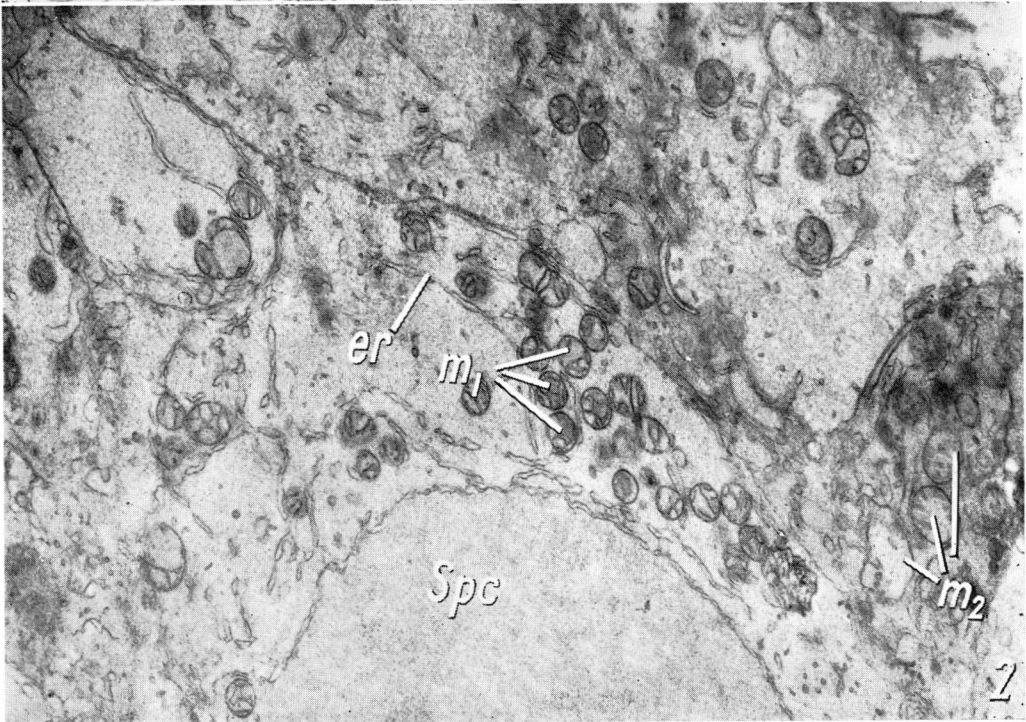
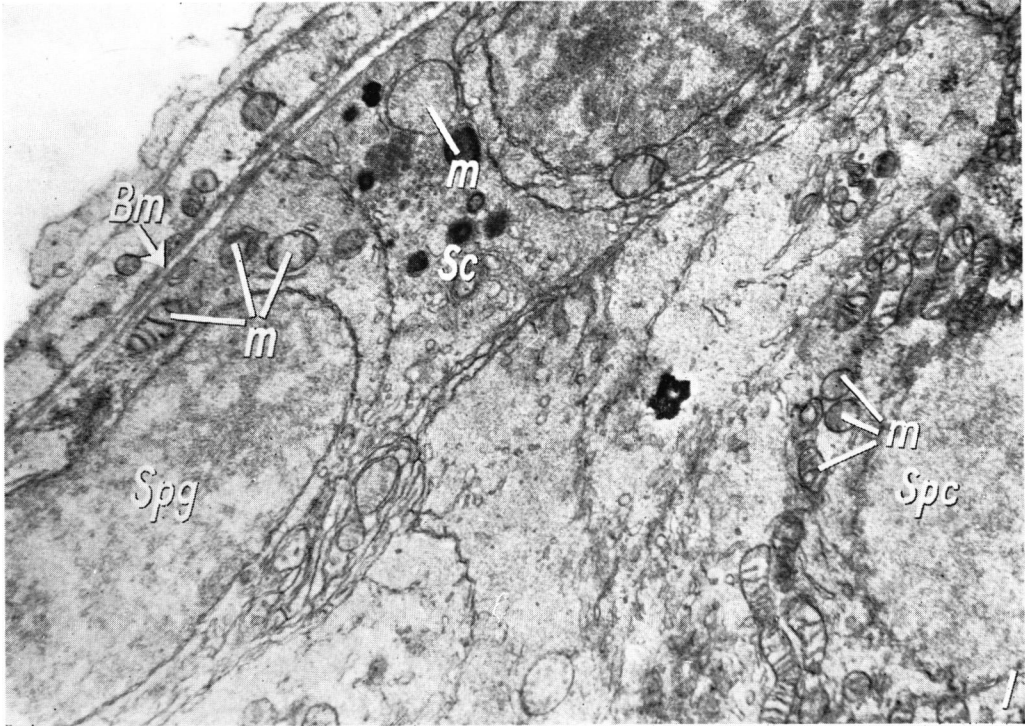
第1図：精細管の基底膜 (Bm) に接し精祖細胞 (Spg) および支持細胞 (Sc) を認め、さらにその内部に精母細胞 (Spc) がみられる。細胞質内には糸粒体 (m) などが存在し、おのおのの細胞により特徴ある構造を示す。

第2図：精母細胞 (Spc) における糸粒体 (m₁)、小胞体 (er) など。一方に支持細胞の糸粒体 (m₂) がみられ、内部構造は精細胞内のものとは大なる差を示している。一般にいわれる線構造が、きわめて鮮明である。

第3図：精子細胞内の Golgi 装置 (gc)。鮮明なる定型的構造を示し、しばしば小胞体 (er) に移行している。なお Golgi 膜の1端が屈曲し、あたかも糸粒体と関連あるかのごとき像を認める (↓)。

第4図：精子細胞内の Golgi 装置 (gc) および発達せる小胞体 (er)。Golgi 胞、小胞体および細胞膜 (cm) などは互に移行像を示す。

串田論文付図(1)



串田論文付図(2)

