

平成2年度科学研究費補助金(一般研究C)

研究成果報告書

厚切り切片法による細胞内構造の立体視

研究課題番号 63570018

平成3年3月

研究代表者 串田 つゆ香

(東京女子医科大学)

(はじめに)

本研究は、厚さ1～5 μmの厚い切片を、加速電圧300 kV透過形電子顕微鏡で立体視することのできる、いわゆる「厚切り切片法の開発」を行い、さらにこの方法を、生物組織のうち、とくにマウス精巣組織へ応用したものである。その結果、いわゆる、厚みの効果により、従来とは異なる多く知見が得られ、すぐれたステレオ観察像を獲得することができた。その方法および観察結果のついて報告する。

今回、行った実験的研究は、つぎのとおりである。

- (1) 厚切り切片のためのエポキシ樹脂 Quetol 651を主体とした包埋法の開発
- (2) 厚切り切片のためのブロック染色法の考案
- (3) 生物組織のうち、とくに精巣組織の細胞内構造の立体視

研究組織

研究代表者：串 田 つゆ香（東京女子医科大学・教授）

研究分担者：飯 島 治 之（東京女子医科大学・助手）

研究経費

昭和63年度	1,100 千円
平成元年度	600 千円
平成2年度	400 千円
計	2,100 千円

研究発表

(1) 学会誌等

- 1) T. Kushida, H. Iijima, H. Kushida and C. Tsuruta: An improved embedding method employing epoxy resin Quetol 651 for stereoscopic observation of thick sections under a 300kV transmission electron microscope. *J Electron Microsc* 37(4)212-214, 1988
- 2) 長戸康和, 嶋井和世, 串田つゆ香, 串田弘: 準超薄切片のためのルテニウムレッド染色法 *細胞* 20(14)568-573, 1988
- 3) 串田つゆ香, 飯島治之, 串田弘, 鶴田忠正: 厚切り切片のための300kV 透過形電子顕微鏡によるステレオ観察のためのエポキシ樹脂Quetol 651改良包埋法 *細胞* 21(6)224-227, 1989
- 4) 長戸康和, 嶋井和世, 串田つゆ香, 串田弘: 準超薄切片のためのルテニウムレッド染色法 - 光学顕微鏡と電子顕微鏡のための包埋後染色 *細胞* 21(1)31-35, 1989
- 5) Y. Nagato, M. Sekiguchi, T. Kushida, H. Kushida and K. Shimai: Use of semithin sections embedded in a water-miscible methacrylate for light microscopy of central nerve tissue. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 66(2-3)145-152, 1989
- 6) T. Kushida, H. Iijima, H. Kushida and C. Tsuruta: En bloc staining available for stereoscopic observation of epoxy resin Quetol 651-embedded thick sections under a 300kV transmission electron microscope. *Proc. Int. Cong. on Electron Microscopy 1990*(3)740-741, 1990
- 7) Y. Nagato, K. Shimai, T. Kushida and H. Kushida: Staining of intestinal goblet cells with ruthenium red in semithin sections. *J Electron Microsc* 39(2)115-119, 1990
- 8) T. Kushida, H. Iijima, H. Kushida and C. Tsuruta: En bloc staining available for stereoscopic observation of epoxy resin Quetol 651-embedded thick sections under a high voltage transmission electron microscope. *J Electron Microsc* 40(1)76-77, 1991
- 9) Y. Nagato, M. Sekiguchi, T. Kushida, H. Kushida and K. Shimai: Correlative light and electron microscopic observations on ectopic neuron in the cerebellum of dreher mutant mouse. *J Electron Microsc* 40(1)11-18, 1991

(2) 口頭発表

- 1) 串田つゆ香, 飯島治之, 藤沢敬子, 串田弘: 厚切り切片における精巣組織の立体観察 第2報. *解剖誌* 63(4)398, 1988

- 2) 串田つゆ香, 飯島治之, 藤沢敬子, 串田弘 : HPMA-Quetol 523-MMA 包埋法の光顕的組織化学への応用. 解剖誌 63(4)403, 1988
- 3) T. Kushida, H. Iijima, H. Kushida and C. Tsuruta: Stereoscopic observation of thick sections of spermatid under a 300kV transmission electron microscope. J Electron Microsc 37(5)282, 1988
- 4) 飯島治之, 串田つゆ香, 串田弘 : 300kV 透過形電子顕微鏡によるマウス精細胞核の観察. 解剖誌 64(1)99, 1989
- 5) 串田つゆ香, 飯島治之, 藤沢敬子, 串田弘 : 300kV 透過形電子顕微鏡によるマウス精細胞核の観察 (II) 解剖誌 64(4)449, 1989
- 6) 長戸康和, 関口雅樹, 串田弘, 嶋井和世, 串田つゆ香 : Dreherミュータントマウスの海馬領域の準超薄切片による観察. 解剖誌 64(4)412, 1989
- 7) T. Kushida, H. Iijima, H. Kushida and C. Tsuruta: Stereoscopic observation of thick sections of spermatocytes under a 300kV transmission electron microscope. J Electron Microsc 38(4)301, 1989
- 8) T. Kushida, H. Iijima and H. Kushida: Stereoscopic observation of thick sections of spermatogenic cells under a 300kV transmission electron microscope. Abstracts of XIII. Fed. Int. Cong. of Anatomy
- 9) 串田つゆ香, 飯島治之, 串田弘 : 300kV 透過形電子顕微鏡による精細胞内構造の三次元的観察. 解剖誌 65(4)279, 1990
- 10) 長戸康和, 関口雅樹, 串田弘, 嶋井和世, 串田つゆ香 : Timm染色法によるdreherミュータントマウス海馬のmossy fiber の観察 - 親水性メタクリル樹脂包埋法の応用. 解剖誌 65(4)257, 1990
- 11) T. Kushida, H. Iijima, H. Kushida and C. Tsuruta: En bloc staining available for stereoscopic observation of epoxy resin Quetol 651-embedded thick sections under a 300kV transmission electron microscope. J Electron Microsc 39(4)285 1990

(3) 出版物

- 1) 串田つゆ香他 (分担執筆) : CORE TEXT 組織学 広川書店, 1989
- 2) 串田つゆ香他 (分担執筆) : 解剖生理学 同文書院, 1989
- 3) 串田つゆ香他 (分担執筆) : 臨床工学シリーズ2 基礎医学 I コロナ社, 1990

(研究成果)

1. 厚切り切片法

1) 固定法

成熟マウスの精巣組織を用い、カコジル酸ナトリウム緩衝の2%オスミウム酸溶液 (pH 7.4) で3時間固定する。同緩衝液で洗浄後、ブロック染色を施す。

2) ブロック染色法

厚切り切片に対するステレオ観察を行う場合には、従来の酢酸ウラニルと鉛塩とによる二重染色法を応用することは不適當である。それは切片の両面と中間部との間に染色性の差が生じ、両面二重染色像としてしまうからである。したがって、厚切り切片に対しては、電子二重染色を行うことなく、ブロック染色法だけによる方法が必要である。その方法は、つぎのとおりである。

- a) オスミウム酸固定した組織片を1% carbohydrazide 水溶液の中に2時間入れる。
- b) 蒸留水で一時間洗浄する。
- c) 1%オスミウム酸水溶液中に2時間入れる。
- d) 蒸留水にて1時間洗浄後、アルコールで1時間脱水する。
- e) 2.5%酢酸ウラニルの50%アルコール水溶液で3時間染色する
- f) 50%アルコールで1時間洗浄する。

g) 60%, 70%, 80%, 90%, 100% (2回) アルコールでおのおの30分脱水する。

3) 包埋法

加速電圧 300 kV に対応できる厚切り切片のための串田式包埋法を開発した。

[包埋材料]

エポキシ樹脂 : Quetol 651

硬化剤 : Nonenyl succinic anhydride (NSA)

Methyl nadic anhydride (MNA)

加速剤 : DMP - 30

置換剤 : n - Butyl glycidyl ether (n - BGE , QY - 1)

Quetol 651は、無色～淡黄色透明で低粘度の液体であり、アルコール、アセトン、n - BGE (QY - 1)、MGE (QY - 2) などに容易に溶解する。また、Quetol 651 は水にも溶解するので、脱水剤としても用いることができる。NSA は Dodecenyl succinic anhydride (DDSA) および MNAより低粘度である。

[包埋剤の組成]

包埋剤の組成は、つぎに示す割合がもっとも適している。

Quetol 651	3.6 ml
NSA	4.7 ml
MNA	1.7 ml
DMP-30	1.5 ~ 2.0 ml

これらの樹脂混合液は、Epon 812 混合液より低粘度で、取り扱いも容易であり、組織への浸透性がすぐれている。重合条件は、60° C にて 24 時間である。この硬さは、室温 20 ° C において、ガラスナイフで 1~5 μ m の厚さの切片を切削するのに適している。硬化物の硬さの調節は、Quetol 651 - NSA 混合液と、Quetol 651 - MNA 混合液との比率を変えることにより可能である。

[包埋操作法]

試料には、主として成熟したマウスの精巣組織を用いた。ブロック染色、アルコール脱水後、包埋に移る。置換剤には、n - BGE (QY- 1) または MGE (QY- 2) を用いる。全行程は振盪器を使用する。

包埋順序

- a) アルコール / n - BGE または MGE
(1 : 1) 15 ~ 30 分
- b) n - BGE または MGE 15 ~ 30 分
- c) n - BGE または MGE / Quetol 651
混合液 (1 : 1) 1 時間
- d) Quetol 651 混合液 1 ~ 2 時間
- e) Quetol 651 混合液 1 ~ 2 時間
- f) ゼラチンまたはポリエチレンカプセルの中に包埋
60° C で、約 24 時間硬化する。

4) 切削法

切片の薄切は、超ミクロトームにガラスナイフを用いて行った。本包埋法によれば、1～5 μm の厚さの切片を容易に作成できる。切片はグリッド上に載物する。従来の電子二重染色は行わない。この厚切り切片に二重染色を施すと、切片の両面と中間層との間に染色性の差を生じ、とくに中間層は染色されないため、この染色法は不適當であった。

5) 電子顕微鏡的観察条件

本包埋法によって作成した1～5 μm の厚切り切片は、300 kV透過形電子顕微鏡における観察が可能である。しかも、包埋剤が、電子線に強くよりすぐれた透過力を有するため、きわめて明るい像が観察できる。

本包埋樹脂を使用する際の特徴として、まず、切片全体に弱い電子線を照射し、樹脂を再度重合させてから、像の観察を行うことである。ステレオ観察のためには、加速電圧300kVの高圧透過形電子顕微鏡に傾斜装置を用い、傾斜角 $\pm 10^\circ$ で行うのが、より適切であった。

2. 観察結果

生物組織のうち、とくに成熟マウスの精巣組織に、この厚切り切片法を応用した結果、いわゆる、厚みの効果により、従来認め難かった多くの知見を得ることができた。著者らが開発した厚切り切片のためのQuetol 651改良包埋法の応用は、本包埋剤が、電子線に対し、きわめて強く、かつ、明るい樹脂のため、1～5 μm の厚い切片が、あたかも超薄切片と同様な感触で観察することができた。

まず、厚切り切片法の研究には、ミトコンドリアが軸系をラセン状に取り巻いていると想定される、精子中間部のミトコンドリア鞘のラセン構築の観察が至適と考えた。精子中間部において、軸系を取り巻くミトコンドリアは4個であること、ラセン軸と軸系とのなす角度は、 23° から 18° まで変化することなどは、すでに著者らが、 $0.2 \sim 0.5 \mu\text{m}$ の準超薄切片法における観察において証明した。今回の厚切り切片法によると、さらに、より深部の従来認め難かった構造も、透過観察することができる。すなわち、軸系を一周する4個のミトコンドリア像は、 $1 \sim 2 \mu\text{m}$ の厚い切片になると、同一横断切片上において、その下層の4個のミトコンドリアが透視され、合計8個の重なりが認められる。しかも、その下層のミトコンドリアは $42^{\circ} \sim 43^{\circ}$ のずれをもってラセン配列していることが証明できた。さらに厚い $3 \mu\text{m}$ の切片になると、その下層である3層目のミトコンドリアの重なりも、同様のずれをもって透視することができた。縦断像では、 $2 \mu\text{m}$ の切片において、軸系を8個のミトコンドリアがラセン状に回旋している像を立体視できる。また、これらのラセン配列は、二重構造を呈していた。従来の電子二重染色を行ったものと、ブロック染色法を施したものとを比較すると、電子二重染色像は、切片の表層両面のミトコンドリアが強染され、中間層のミトコンドリアは染色されず、白く抜けてしまい、両者との間に著明な染色性の差が生ずる。一方、ブロック染色を行った切片は、深部にいたるまで均等に染色されるため、たとえば、ラセン状に配列されている様相を立体的に、より正確に把握することができた。

精子発生における精細胞の核、小胞体、ミトコンドリアやゴルジ装置などの細胞小器官の超微細構造も、厚い切片の効果により、従来の超薄切片では認め難かったおのおのの立体像を観察できた。各段階における精細胞の核質は、決して均質性ではなく、いずれの核においてもクロマチンの細系構造がみられる。また、第一次精母細胞の分裂中期における染色体および紡錘微細管は、深在のものとともに完全な立体構造を観察することができた。精母細胞の分裂前期に認められる *synaptonemal complex* は、従来の超薄切片では断片的な平行線としてみられ、ときに核膜に付着していた。しかし、本法による観察では、すべてが断片像ではなく、核膜から核膜へと連なる長い全体像を把握できる。しかも、おのおのの染色体は、たがいに数回の交叉を示している。また、精母細胞には、数個の核小体がみられるが、*pachyten* 期の進行にともない、おのおのの核小体が核内を移動し、*sex vesicle* の周辺において網の目構造を呈している。これらは、やがて性染色体を中心に、その周囲を取り囲むようになる。なお、XおよびY染色体も明瞭に立体視することができた。精子細胞核は、従来認め難かった核小体が、約3個保有していることが確認できた。しかも、これらの核小体は、比較的成熟後期にいたるまで、なお、観察可能であった。また、尖体形成過程における核膜の陥凹やゴルジ装置の構造などは、その推移を立体的に把握できる。この時期のゴルジ装置内には、いずれも鮮明なディプロゾームを認め、中心小体から放射状の配列する細系構造などは、超薄切片では観察不可能であった立体像である。

(結 語)

本研究は、加速電圧300kV に対応できる厚切り切片法のための串田式包埋法、ブロック染色法の開発および、これらの細胞学分野への応用を行ったものであるが、本法により、従来認め難かった細胞内諸構造の三次元的解析を可能にした。とくに、著者らの長年の研究テーマである精巢組織に応用した結果、精子発生過程における各精細胞の細胞内小器官などの超微形態的変動を三次元的に追及することができた。

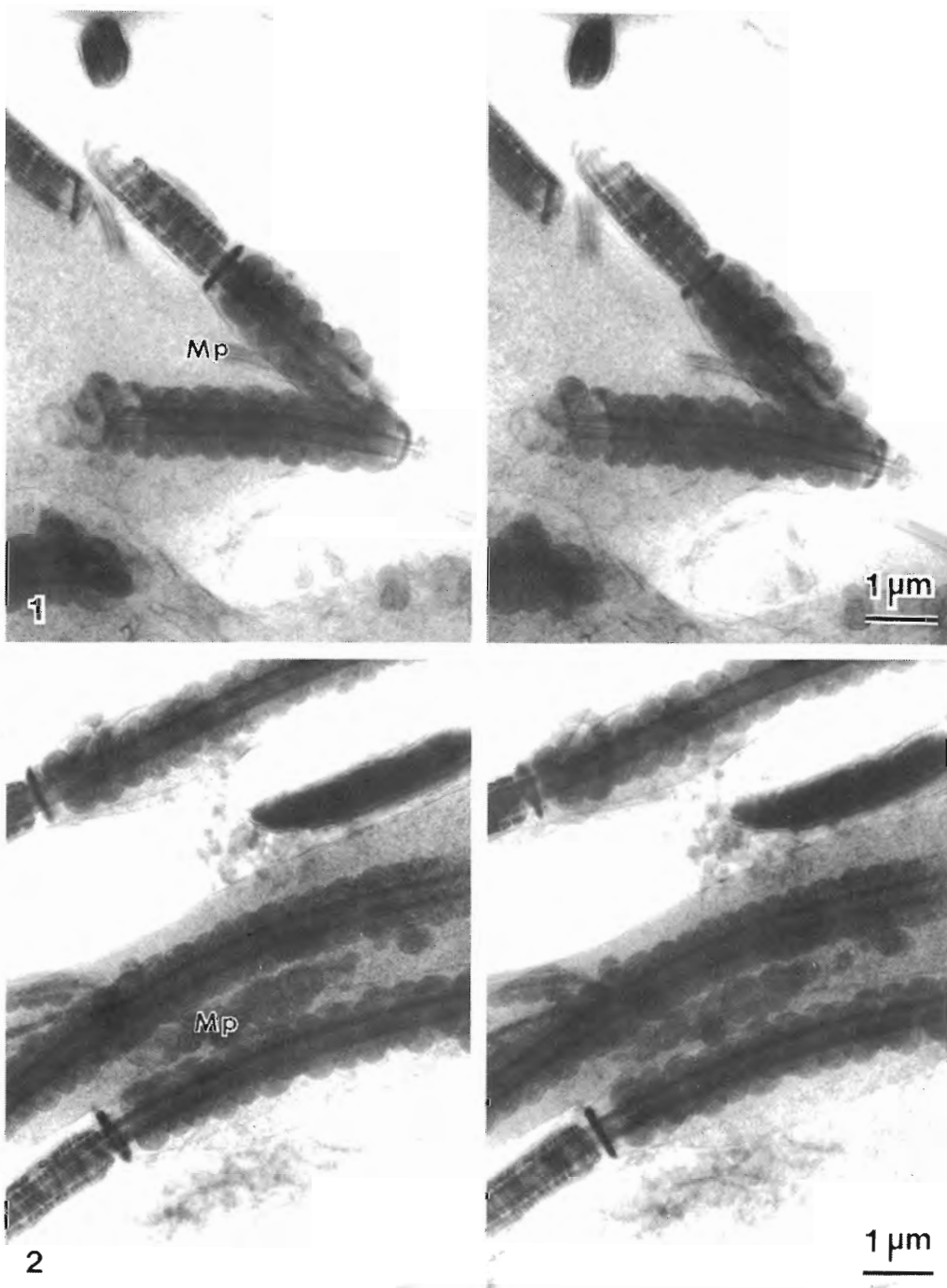


図1 厚さ2 μの厚切り切片のステレオ観察像（傾斜角±10°）

Mp = 精子ミトコンドリア鞘中間部

図2 厚さ3 μの厚切り切片のステレオ観察像（傾斜角±10°）

Mp = 精子ミトコンドリア鞘中間部