

〔原著〕

Quetol 651 包埋法による厚切り切片を用いたマウス精子細胞尾部のミトコンドリア鞘の高圧電子顕微鏡的観察

飯島 治之

HIGH VOLTAGE TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION OF THE MITOCHONDRIAL SHEATH OF MOUSE SPERMATIDS EMBEDDED IN QUETOL 651 BY THICK SECTION

Haruyuki IJIMA

マウス精子細胞におけるミトコンドリア鞘の形成過程の三次元構造を観察することを目的として、厚切り切片の作成の可能な Quetol 651 包埋法をマウスの精巣組織に対して応用し、加速電圧 200 または 300kV の高圧電子顕微鏡により観察を行った。Quetol 651 包埋法は、電子線に対する透過度がきわめて良好で明るく、ビームダメージに対する耐久性に優れており厚切り切片による細胞内器官の三次元構造の観察を可能としている。したがって、従来の超薄切片においては認めることのできなかつた精子発生過程における精子細胞のミトコンドリア鞘形成に伴うミトコンドリアの動態や三次元配列を解明することができた。この方法は、精子形成過程における細胞内諸器官の三次元構造の解析について、きわめて有効なものである。

キーワード：厚切り切片、Quetol 651、精子細胞、ミトコンドリア鞘、300kV 高圧電顕

Abstract

The morphological observation of the mitochondrial sheath of mouse spermatids by thick section embedded in water-miscible epoxy resin Quetol 651-NSA-MNA mixture was examined under 200 or 300kV transmission electron microscope (TEM). The thick sections about 1~3 μm are including numerous cellular components in their thickness, although it is difficult to observe by ordinary electron microscope. Because, the electron beam is not penetrated through the thick section. The embedding method used Quetol 651 is obtained clear and strong section under high voltage electron beam compared to normal epoxy resin. Therefore, it is able to observe at 1~3 μm thick section under high voltage electron microscope. It is applied to this method for the observation of the mitochondrial sheath of the mouse spermatids. In conclusion, the three-dimensional formations and arrangement pattern of mitochondria of the mitochondrial sheath in spermatid are recognized by thick section. Therefore, this embedding method using Quetol 651 is useful to analyze the three-dimensional structure of several cellular components in spermatogenesis.

Key Words : thick section, Quetol 651, spermatid, mitochondrial sheath, 300kV TEM.

結 言

従来、電子顕微鏡による細胞組織の形態的な観察はエポキシ包埋し、0.1 μm 以下に薄切した切片が用いられ、細胞内諸構造のある特定の断面の微細形態が観察されてきた。しかしながら、精巣組織にみられる精母細胞のミトコンドリアや精子細胞のミトコンドリア鞘は精子発生過程の進行に伴い、形態的な変化を示す複雑で立体的な構造であり、このような細胞内諸器官の全体的構造を観察するためには従来用いられている超薄切片では切片の厚さが薄いため断片的な情報しか得られないため観察が困難であった。これらの立体構造の観察は連続切片を作成して再構築するか、あるいは1 μm 以上の厚切り切片を作成し、電子線の透過力の強い加速電圧1000kVの超高压電子顕微鏡で観察する方法がとられてきた。しかし、連続切片法は多数の切片を作成し、さらにそれらを欠落なく重ねてトレースし再構築する過程は多大な労力と時間を必要とし容易な作業ではない。また、厚切り切片法の場合、従来用いられているエポキシ樹脂包埋法^{1),2)}は樹脂の分子量が大きいため切片に対する電子線の透過率が悪く、暗くて観察が困難であり、さらに電子線に対して弱いため損傷が激しく、より簡便な立体観察の方法が必要とされてきた。一方、共焦点レーザー顕微鏡は蛍光色素を使用することにより、ある特定の細胞内物質の断面をコンピュータ解析により三次元的に観察することを可能としたもので、光学顕微鏡レベルの三次元解析には優れた方法である。しかし、電子顕微鏡のように多くの細胞小器官の内部構造を詳細に観察することはできない。近年、串田らが開発したQuetol 651を主体としたエポキシ樹脂包埋法³⁾は、電子線の透過度が従来のエポキシ包埋切片と比較してきわめて良好であるため、切片が明るく観察しやすく、さらに電子線によるダメージに対する耐久性に優れているため、厚さ1~3 μm の切片においても、加速電圧200~300kVの高圧電子顕微鏡で細胞内構造を損傷なく観察が可能である。このQuetol法で包埋したマウスの精巣組織の厚切り切片を作成し、精子発生過程において出現する精子細胞尾部のミトコンドリア鞘の形成過程についての観察を行った。

材料および方法

材料は成熟雄マウス(C3H/He系、10週令)を用いた。エチルエーテルによる十分な麻酔を施した後、精巣

組織の摘出を行った。摘出した組織は約3ミリ角に細切して、カコジル酸で緩衝した2%オスミウム溶液により約3時間の固定を行った。0.1Mカコジル酸緩衝液で30分ずつ2回洗浄した後、1%カーボヒドライド水溶液中で約2時間のブロック染色のための架橋処理を行った。蒸留水で1時間洗浄した後、1%オスミウム水溶液で約2時間、2.5%酢酸ウラニルの50%エタノール溶液で約3時間のブロック染色³⁾を施した。蒸留水による水洗後、エタノール系列による脱水を行い、水溶性エポキシ樹脂Quetol 651-36ml, NSA-47ml, MNA-17mlに加速剤DMP-30を1.5ml加えた混合液に包埋した。組織はゼラチンカプセルに封入し約60°Cの恒温槽において約24時間の重合を行った後、硬化したブロックはガラスナイフを用い、JB-4マイクロトームにより厚さ1, 2, 3 μm の切片を作成した。切片はロジウムコートをしたグリッドにのせ、日立H-9000型高圧電子顕微鏡により200または300kVの加速電圧下において観察した。

また、比較のために用いた0.5 μm の切片は同様の材料に対してカコジル酸で緩衝した2.5%グルタルアルデヒドと2%オスミウム溶液による二重固定を施し、脱水を行った後、Quetol 812に包埋したものをを用いた。通常の電子二重染色を施し、100kVの透過型電子顕微鏡で観察した。

観察結果

マウス精細管における精子および精子細胞の中部のミトコンドリア鞘は中心となる軸糸の周囲をミトコンドリアが螺旋状に取り囲む、長さ5~7 μm で、太さが約1 μm の構造であり、精子発生過程における精子細胞期に形成される。その形成過程は細胞質全体に分布する多数の球形のミトコンドリア(直径0.5~0.7 μm)が軸糸の周囲に集合し、さらにそれらが互いに融合することにより形成されるような複雑な立体構造の変化を示す。今回の厚さ1~3 μm の厚切り切片を用いた観察では切片の厚さに応じてミトコンドリア鞘の構造のかなりの部分または、ほぼ全体が切片の厚さの中に封入されるため、ミトコンドリア鞘全体像の観察が可能である。

【ミトコンドリア横断像-厚さ1 μm 】

厚さ約1 μm の切片におけるミトコンドリア鞘の横断像では、軸糸の9+2構造の断面とその軸糸を中心としてほぼ90度の角度の位置に配列する4個のミトコンドリアが観察される(図1)。これらのミトコンドリアは直径が0.5-0.7 μm で軸糸に接する部分が凹型にへこんだ球状

を呈する。さらにミトコンドリアが軸糸に接する両端に隣接するミトコンドリアが重なり合う電子密度の高い部分が存在する (図1*)。

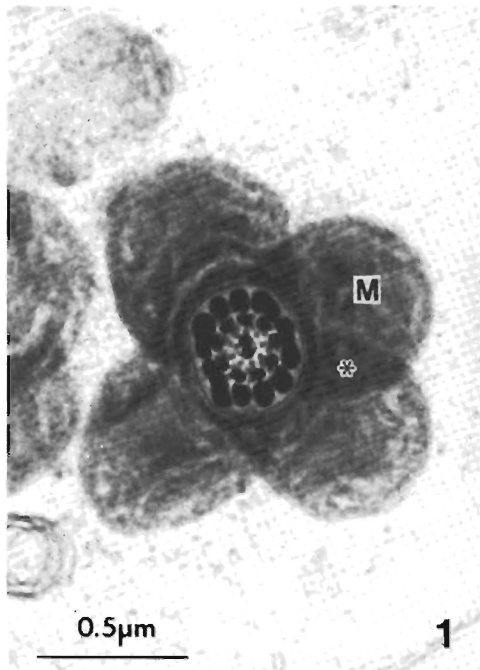


図1 厚さ約1 μmの切片におけるミトコンドリア鞘の横断像

軸糸の9+2構造が明瞭に観察される。さらに軸糸を中心として互いに直交するように4個のミトコンドリア (M) が配列する。また、隣接するミトコンドリアの間に部分的に互いが重なる電子密度の高い部分が観察される (*)。倍率：40,000倍

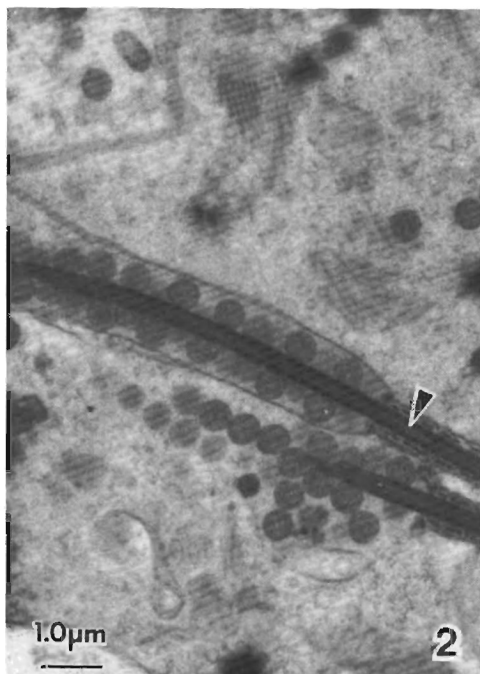


図2 厚さ約0.5 μmの切片におけるミトコンドリア鞘の縦断像

軸糸の中心に縦に走行する電子密度の高い線 (矢印) がみられることから、ほぼ軸糸の中心で切れた縦断像であるが、切片が比較的薄いため、ミトコンドリアの明瞭な断面が間隔をおいて観察される。倍率：8,000倍

【ミトコンドリア縦断像-厚さ0.5 μ】

従来の切片に近い厚さの約0.5 μの切片のミトコンドリア鞘の縦断面像では軸糸およびミトコンドリアの断面が観察される。軸糸は中心に電子密度の高いライン (矢印) がみられる。ミトコンドリアの断面は軸糸をはさんで2個対で5組観察されるが、それらの間には0.5-1 μの間隙が認められる。さらにその間隙には電子密度の低く輪郭が不鮮明なミトコンドリアと思われる構造が認められる (図2)。また、ミトコンドリアの断面にはクリスタが観察される。

【ミトコンドリア縦断像-厚さ3 μ】

切片の部位によってミトコンドリア鞘の含まれかたが異なるが、ここでは、ミトコンドリア鞘のほぼ全体像が観察される。ミトコンドリアは球形をしており間隔をおかず連続して配列することがわかる。クリスタは認められない。とくに軸糸および軸糸の上に配列するミトコンドリアの両方が観察できるため全体的な配置を把握することができる。ミトコンドリアの配列は軸糸の垂線方向に軸糸を横切って連続して直線的に並んでいる (a-b, c-d) (図3)。

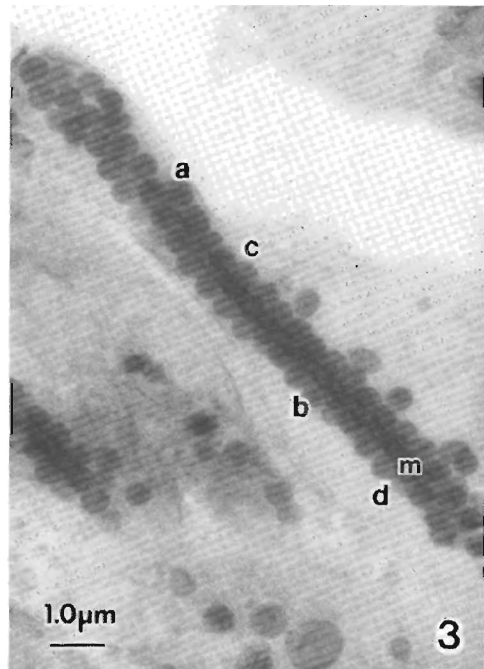


図3 厚さ約3 μmの切片におけるミトコンドリア鞘の縦断像

3 μの厚みの中にミトコンドリア鞘の全体が封入されていることにより、軸糸上に配列するミトコンドリア (m) も確認できるため隣接するミトコンドリアの位置関係を把握することができる。倍率：7,000倍

【軸糸を含まないミトコンドリア縦断像-厚さ2 μ】

軸糸と平行な面でスライスされた軸糸を含まない厚さ2 μの切片では斜めに連続して配列する4本のミトコン

ドリア列が観察される。また、この像では配列するミトコンドリアのうち両端に位置するミトコンドリアの電子密度が低く、中心に位置するミトコンドリアの電子密度が高いことが確認できる。さらに電子密度の低いものにはクリスタと思われる縞模様が観察される（図4）。

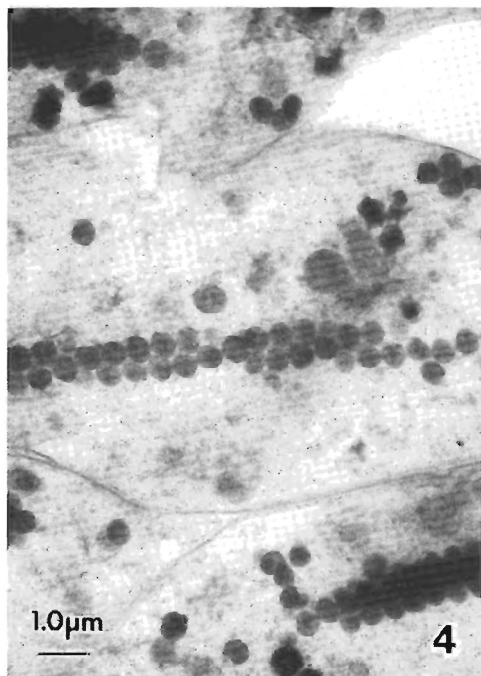


図4 厚さ約2 μmの切片におけるミトコンドリア鞘の縦断像

軸糸の垂線と平行で軸糸を含まずに切れた切片像。表層部分のミトコンドリアの配置が確認できる。斜めに走行する4本のミトコンドリア列が観察されるが、両端に位置するミトコンドリアの電子密度が低く中心のものが高い。

倍率：6,000倍

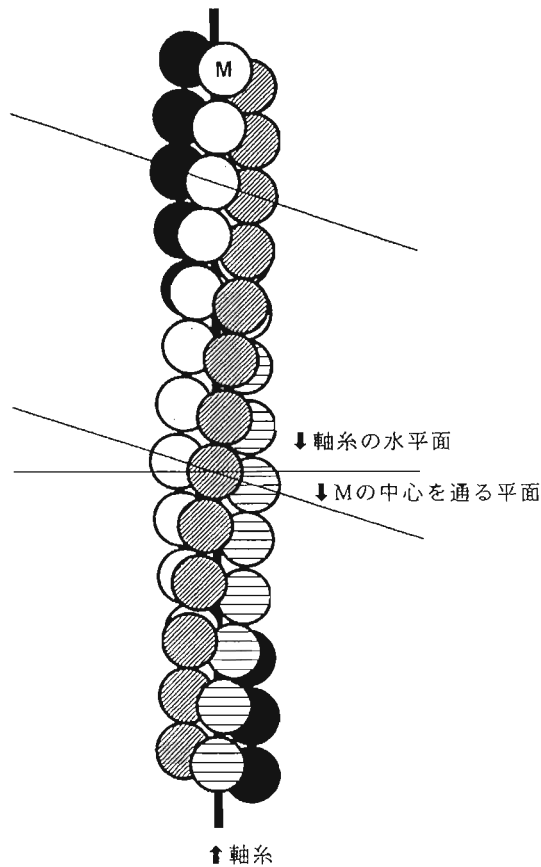
考 察

マウス精子尾部のミトコンドリア鞘の形成過程に関する研究はWooley⁵⁾、Barad⁶⁾および大谷⁷⁾による走査顕微鏡を用いた報告がなされているが、切片を用いた透過電子顕微鏡による観察はほとんどが部分的な断面の微細構造を記載したものであり、三次元的構造に関する報告はなされていない。これは従来の超薄切片を用いた観察ではミトコンドリア鞘のような立体構造の全体像を把握することが困難であるからと考えられる。今回のQuetol 651包埋法を用いたマウス精巣組織の観察は、電子線の透過度が良好であるため従来の超薄切片の30倍の厚さの3 μmの切片を観察することが可能であり、超薄切片では切片が薄すぎることにより、その部分的な構造を把握することしかできなかった精子細胞のミトコンドリア鞘の全体を観察できるため、その形成過程を解明すること

ができた。図1では中心の軸糸の9+2構造が明瞭に認められることからミトコンドリア鞘に完全に直交する横断面像であることがわかる。ここでは4個のミトコンドリアが互いにほぼ直角に配列しているのが確認されている。したがって、ミトコンドリア鞘形成の初期においてミトコンドリアは4個で軸糸を一周するように配列することが判明した。また、隣接するミトコンドリア間に電子密度の高い部分（図1*）が確認されるが、これはミトコンドリアの重なりによって生じるものであり、従来の切片では、このような重なり合う構造の電顕像を得ることは困難である。したがって、隣接するミトコンドリアの配置はやや上下にずれており軸糸に直交する水平面上に配列するのではないことが推測できる。

また、ミトコンドリア鞘の縦断面における観察では厚さ0.5 μmの切片（図2）の場合、軸糸の中心がみられる（矢印）ことから正中面で切れた像であるが、切片が薄いためクリスタのみられるミトコンドリアの断面が間隔をおいて確認されるのに対して厚さ3 μmの切片（図3）では軸糸上に位置するミトコンドリアも観察可能であるためミトコンドリアが間隔をおかず連続して配列するのが確認でき、さらに隣接するミトコンドリアの位置関係を明瞭に把握することができた。図3を詳細にみると軸糸を取り巻くミトコンドリアはaからbおよびcからdにかけて10個のミトコンドリアが軸糸を横切るように直線的に配列しているのが確認される。このことはミトコンドリアの配列が軸糸の垂線に対して10個で反対側に達するような『ねじれ』が存在することを意味している。さらに図4でも同様に4本のミトコンドリア鎖が連続して斜めに配列しているのが確認されている。これらのミトコンドリアは両端のミトコンドリアの電子密度が低く、中心に位置するミトコンドリアの電子密度が高いことから中心部分のミトコンドリアはほぼ全体が切片内に封入されているのに対して末端部では切片内に部分的に存在することがわかる。したがって、図4にみられるミトコンドリア鎖は両端のミトコンドリアが切片内に部分的に含まれ、中心のものは全体が含まれるようなアーチ状に配列するものと考えられる。これらの結果から考えると、ミトコンドリア鞘形成過程におけるミトコンドリアの配列は模式図に示すように4本のミトコンドリア鎖が軸糸に対して螺旋状に取り巻き、さらにその1本の螺旋鎖はミトコンドリアがほぼ10個で軸糸を半周するように配置しているものであることが推測される。また、横断面でも示したように軸糸に直交する水平面と隣接するミトコンドリアの中心を通る平面のなす角度は20-23度

程度であるものと考えられる。したがって、精子細胞のミトコンドリア鞘は、ミトコンドリアが軸糸に集合する時点において、すでに4本のミトコンドリア鎖が螺旋状に規則正しく配列し、その後、隣接するミトコンドリアが融合することにより形成されることが確認できた。この結果は、Wooleyによる走査顕微鏡の観察結果と一致する。



模式図 ミトコンドリア鞘形成初期のミトコンドリア配置の模式図

結 論

エポキシ樹脂 Quetol 651 を主体とした樹脂混合液包埋による厚さ1~3 μm の切片を用いた加速電圧300kVの高圧電子顕微鏡によるマウス精巣組織の観察は、従来の超薄切片では確認できなかった精子細胞のミトコンドリア鞘におけるミトコンドリアの立体的配置や三次元構造の形態変化を把握することを可能にした。その結果、ミトコンドリア鞘形成過程におけるミトコンドリアの動

態を解明することができた。今後、この方法を応用することにより、従来では観察が極めて困難であった様々な精細胞内諸器官の三次元構造を解析することが可能になるものとする。

謝 辞

本稿を終えるにあたり長年の共同研究者であり、本研究の指導を賜りました東京女子医科大学名誉教授・串田つゆ香先生および技術的な指導を賜りました串田弘博士に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Luft JH: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol.*, 9, 409-414, 1961
- 2) 串田弘、串田つゆ香: Quetol 812 改良包埋法 I. 細胞, 15, 27-28, 1983
- 3) Kushida T, Iijima H, Kushida H et al.: An improved embedding method employing epoxy resin Quetol 651 for stereoscopic observation of thick section under a 300kV transmission electron microscope. *J Electron Microsc.*, 37, 212-214, 1988
- 4) Kushida T, Iijima H, Kushida H et al.: 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, 76-77, 1991
- 5) Wooley DM: The midpiece of the mouse spermatozoon: Its form and development as seen by surface replication. *J Cell Sci.*, 6, 865-879, 1970
- 6) Baradi AF, and Rao NS: On the development of midpiece mitochondria of mouse spermatozoa. *Cell Tissue Res.*, 199, 349-352, 1979
- 7) Otani H, Tanaka O, Kasai K et al.: Development of mitochondrial helical sheath in the middle piece of the mouse spermatid tail: Regular dispositions and synchronized changes. *Anat Rec.*, 222, 26-33, 1988