

## 2) 細胞内小器官表面の微細構築と分子局在を総合的に捉える新たな顕微鏡観察技法の開発

研究代表者 渡部 剛

### [研究の背景と目的]

一般に、生体の3次元的な微細構築の把握には走査型電顕 (SEM) 観察が適しているが、従来の SEM 観察標本作製法では、下垂体前葉など多種類の内分泌細胞が混在する組織中で特定の細胞を正確に同定し解析することは困難であった。そこで、本研究では、この標本作製法を改良することで、複雑な細胞構成からなる組織標本上で特定の細胞を正確に同定し、さらにその細胞内の内膜系小器官の立体構築を SEM で自在に観察できる技法を開発した。

### [研究方法]

組織標本の固定と氷晶形成防止処理：8週齢の Wistar 系雄ラットを 0.5% グルタルアルデヒドと 0.5% パラフォルムアルデヒドを含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で灌流固定し、切除した下垂体組織を細切後、1% 四酸化オスミウム溶液で浸漬固定した (1時間、4℃)。固定された下垂体組織は、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄後、1.84 M sucrose - 20% PVP を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に浸漬して氷晶形成防止処理を行った。

凍結組織標本の切削と任意の組織準超薄切片の取得：氷晶形成防止処理を施した下垂体組織は、凍結超薄切片作製用試料ホルダーに載せ、液体窒素で急速凍結した後、凍結切削ユニットを装着したウルトラミクロトーム (Leica UC7) により -80℃ の低温環境下で薄切した。得られた 1 μ 厚の凍結組織切片は、あらかじめシランコーティングを施したスライドガラス上で伸展させ、トルイジンブルーによる組織染色および抗下垂体前葉ホルモン抗体を用いた免疫組織化学染色に供した。一方、組織切片を切削した後に残された組織ブロックは、ミクロトームから脱着し、上記の氷晶形成防止液中に再び浸漬して解凍した。

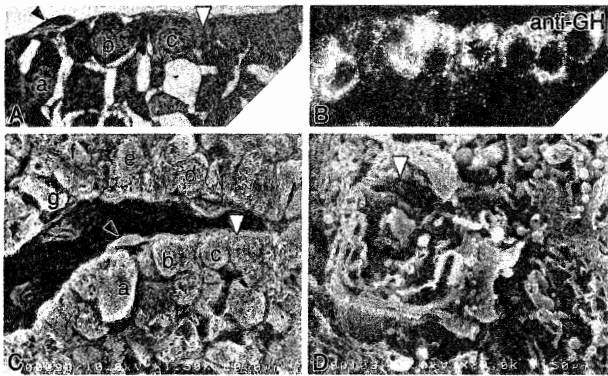
オスミウム浸軟処理による SEM 観察標本の作製：凍結切片取得後、解凍した下垂体組織ブロックは、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄後、0.1% 四酸化オスミウム溶液に浸漬して、細胞内膜系小器官の追固定と細胞質成分の溶出処理 (浸軟処理) を行った (72時間、25℃)。浸軟処理後、下垂体組織を再び 1% 四

酸化オスミウム溶液で浸漬固定し (1 時間、4℃)、さらに、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄後、1% タンニン酸および 1% 四酸化オスミウム溶液に浸漬して導電処理を行った。導電処理を施した下垂体組織標本は、さらに常法に従って脱水、臨界点乾燥、金属蒸着処理を行い、走査型電子顕微鏡で観察した。

[研究結果]

今回作製した下垂体組織標本で対応する部位の光学顕微鏡像 (A (トルイジンブルー染色像)、B (抗 GH 抗体による蛍光免疫染色像)) と SEM 観察像 (C (低倍像)、D (高倍像)) を右下図に示した。

SEM 観察標本の断面に隣接する凍結切片を一般染色し光学顕微鏡で観察すると、SEM 観察標本で観察される細胞を正確に同定することができた (図 A および C の a、b、c)。さらに、隣接切片を免疫染色したところ、この領域には GH 産生細胞が集積していた。そこで、対応する下垂体組織断面を SEM で倍率を上げて観察すると、板状のゴルジ層板を有する球形のゴルジ装置が観察され、GH 細胞におけるゴルジ装置の微細構造の立体的な特徴が明らかになった (図 A、C、および D、白矢頭)。



[まとめ]

今回の研究では、透過型電顕観察のための凍結超薄切片法のプロトコールをオスミウム浸軟標本作製に応用することによって、従来の DMSO 割断法に匹敵する SEM 観察用標本が作製できた。この方法を用いれば、従来の DMSO 割断法ではこれまで困難であった、SEM 観察視野と対応した組織切片の採取ができ、多種類の細胞からなる複雑な生体組織中で目的の細胞を正確に同定して、その細胞内小器官の立体的な微細構

造を解析できる。さらに免疫組織化学標識のタイミングや反応条件を工夫することで、将来的には、SEM 観察用の組織標本上で直接的に分子局在を可視化する方法にまで、この技法を発展させたい。