

## 超高压電子顕微鏡を用いた細胞小器官の観察

## Observation of Cell Organelles with HVEM

野 田 亨

Toru Noda

<sup>a</sup> 藍野大学 医療保健学部 理学療法学科

**要 旨** 超高压電子顕微鏡を用いた厚切り切片の観察からは細胞内小器官の真実に近い立体構造を捉えることができる。しかし、そのためには選択的に細胞小器官を染め出す組織化学的な方法が必須となる。本稿では超高压電子顕微鏡で厚切り切片を観察する場合に使われる種々の染色法、細胞小器官の立体構造の具体例などを紹介する。

**キーワード**：超高压電子顕微鏡，組織化学，細胞小器官

## 1. はじめに

細胞、細胞小器官、組織が本来、どのような形をなしており、その周囲の構造とどのような位置関係にあるかという基本的な問題は判っているようでいて、不明な点が少なくない。電子顕微鏡を使って観察すれば判りそうなものであるが、個々の構造の断面は見えるが、全体の広がりはどうなっているのかは想像するしかない。その想像が正しいかどうかはわからない。そうした基本的な疑問に対して答える一つの手段として超高压電子顕微鏡を用いた観察方法がある。

## 2. 超高压電子顕微鏡で細胞を見ること

細胞や細胞小器官の細部の構造は電子顕微鏡で観察しないとわからない。細胞を人体構造の基本的な単位と考えると、多くの場合、10  $\mu\text{m}$  ではぼ1個の細胞の厚みをカバーしていると考えられる。それに比べて通常の電子顕微鏡用の超薄切片の厚さは30 nm 前後であり、超薄切片像は立体の一断面という表現をせざるを得ない。この限られた情報から細胞全体の構造を推測するには無理がある。筆者らが主として用いている1000 kV 程度の超高压電子顕微鏡では1  $\mu\text{m}$  から数  $\mu\text{m}$  までが観察に適した切片の厚さであると思われる。この厚さでも1つの細胞全体を1枚の厚切り切片内に収めることはできないが、比較的小型の細胞小器官か細胞小器官の一部を切片内に収めることはでき、その立体観察は可能である。

超高压電子顕微鏡といっても、切片を観察する透過型電子顕微鏡であるので、観察する切片内に高電子密度の対象物が存在すれば、何らかの像を作り出すことはできることになる。

試料に含まれる基本的構造である膜、基質、線維構造などを高電子密度に修飾する方法は主に超薄切片像のコントラストを高める方法として、いくつか知られている。それらには後固定に用いられる四酸化オスミウムの他に、電子染色として酢酸ウラニル、クエン酸鉛を代表とする各種鉛溶液、また後固定時に電子密度を上げるためにオスミウムを一部、還元させる作用を持つフェロシアン化カリウムを含むもの、あるいはタンニン酸処理されたものなどが含まれる。しかし、注意しなければならないのはこれらの染色によって明瞭になる構造は主として細胞骨格や膜系のアウトラインであるという点である。一般的に膜からなる立体を含む厚切り切片を透過型の電子顕微鏡で観察した場合、三次元空間に広がった膜系を二次元平面に投影した像となり、超薄切片像とはかなり異なった像となる。つまり像はその膜のアウトラインが電子線の光軸に沿って重なれば、濃い線状の影となり、それ以外では淡い平面状の影となるだけである。要するに超薄切片の像の輪郭やコントラストを高めるためのこれまでの染色方法は超高压電子顕微鏡では複雑なアウトラインの重なり合いとしてしか表現できないことになる。

## 3. 細胞小器官の形状を見るためには組織化学的染色はかせない

それではどのように染めれば意味のある立体像を得ることができるか。筆者の経験では最も明瞭な構造を描き出すことのできる染色法はオスミウムや銀などを用いた古典的特殊染色法である。これらの染色法にはその染色機構が不明で、細胞小器官のどのような物質と反応しているかが判らないものが多い。しかしながら一度染まると、他のどのような染色法で見るとより鮮明にある構造を描出することができるという、捨てがたい方法である。これには Friend のオスミウム法<sup>1)</sup>、Zinc-Iodide-Osmium (ZIO) 法<sup>2)</sup>、硝酸銀を用いるゴルジ法<sup>3)</sup>

<sup>a</sup> 〒567-0012 大阪府茨木市東太田4-5-4  
TEL: 072-627-1711; FAX: 072-627-1753  
E-mail: t-noda@pt-u.aino.ac.jp  
2008年8月30日受付

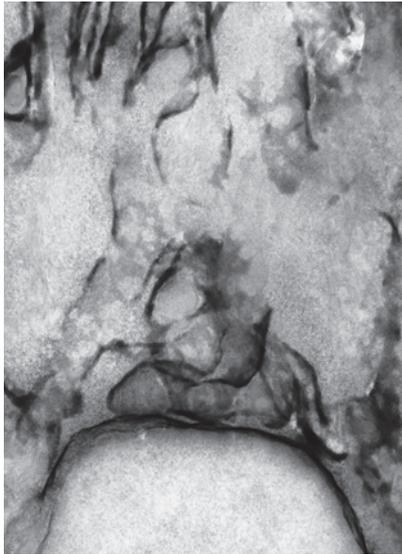


図1

図1 ラット小腸吸収上皮細胞，抗 Calreticulin 抗体を用いた酵素抗体法で染色された小胞体，および核膜。核膜や小胞体の立体的広がりや小胞体にある大小不同の孔が確認できる。1  $\mu\text{m}$  厚切片，1000 kV。

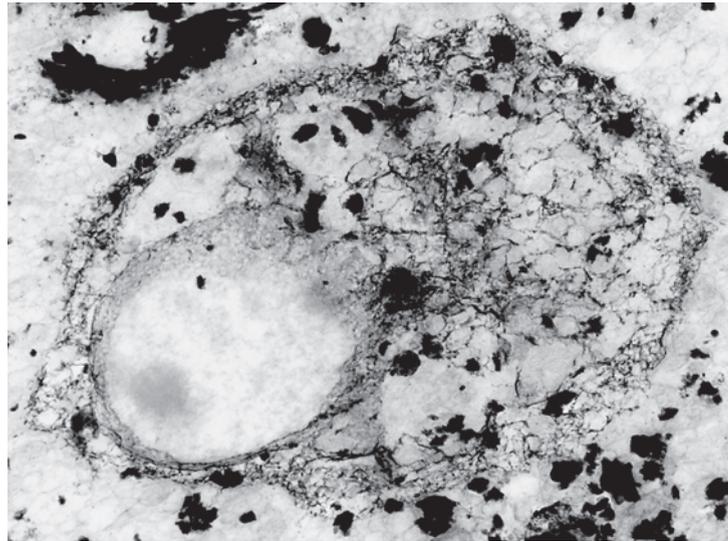


図2

図2 ラット精巣上皮細胞，Zinc-Iodide-Osmium (ZIO) 染色で染色された小胞体，および核膜。細胞質全体に広がった網状の小胞体と核膜の曲面が明瞭に示されている。核膜には染色されない無数の核膜孔の分布を認めることができる。1  $\mu\text{m}$  厚切片，1000 kV。

などが知られている。

次には重金属を用いた酵素組織化学による染色法が挙げられる。上記の古典的特殊染色法に比べると酵素組織化学は酵素と基質というある程度の特異性があり，再現性が高い。また免疫組織化学は抗原が存在する限り標識するのに対して，酵素組織化学は酵素が活性を表していると考えられ，免疫組織化学では表現できない生理的状态をもある程度反映させることも可能な標識法である。ただ，一つの酵素が化学構造上似たような基質を分解しうること，あるいは組織中で一つの基質を複数の異なる酵素が分解しうる可能性も考えておかなければならない。AcPase や TPPase などのフォスファターゼ類では生じたリン酸を鉛等の重金属で結合させ，酵素の局在する部位に定着させる。サイトクロームオキシダーゼ，ペルオキシダーゼなどの酸化還元酵素類では，最終的にオスミウムを還元，不溶化することによりその酵素の存在部位を高電子密度に染め出す。この後者の例は次に述べる酵素抗体法の最終反応産物と原理的に同じである。超高圧電子顕微鏡で観察することを前提とする場合は，対象とする構造体をくまなく描出するほどの酵素と組織との組み合わせを選ぶ必要がある<sup>4)</sup>。

細胞小器官の大まかな分布であれば，細胞小器官を形づくる構造蛋白を標識するか，袋状の構造なら内部に均等に存在する可溶性蛋白を標識することにより，その局在を把握することが可能である。すなわち蛍光抗体法などの免疫組織化学である構造にのみ認められる蛋白を特異抗体で標識すれば，切片に含まれる蛋白の分布を把握できるのであるが，あくまでそれは光顕レベルの所見である。電子顕微鏡レベルで免疫組織化学を行おうとすると，蛋白の標識はコロイド金粒子を

用いる方法か，最終的に DAB 反応産物の局在から見る酵素抗体法になる。電顕レベルで標識感度が良いとされる凍結超薄切片や樹脂包埋した試料の超薄切片上にコロイド金粒子で標識する免疫金標識法では点状に示された箇所での蛋白の標識があることが理解できるが，それらの分布が全体としてどのような形を成すかという推測は一般的に困難である。今のところ光顕所見と電顕所見との間の形態的，免疫組織化学的な特徴を直接つなぐパイプは酵素抗体法である。しかし，この方法も通常の加速電圧を持つ電子顕微鏡では観察可能であっても，超高圧電子顕微鏡下では細胞小器官の三次元構造の描出にはまだ困難があり，さらなる電子密度の増加が求められる。

#### 4. 超高圧電子顕微鏡を用いた細胞小器官の観察

上記の細胞化学的染色法で高電子密度に染め出された試料，そこから切り出された厚切り切片，そして厚切り切片をも観察可能とする強力な透過力を持つ超高圧電子顕微鏡という三者の組み合わせにより，細胞内の構造を標識し，その立体的広がりを観察することができる。最終的に高電子密度の反応産物を細胞小器官に残すことにより，その標識を立体的に捉えることができるというわけである。次に各細胞小器官の超高圧電子顕微鏡で観察されたいいくつかの例を簡単に説明してみたい。

##### 4.1 核，核膜，核膜孔，有窓層板

細胞の核には細胞質との間に核膜孔という核膜に特有の穴がある。核膜は外膜，内膜の2枚の膜でできており，核膜内腔は小胞体の内腔と連絡を持つ部分もあるので，calreticulin

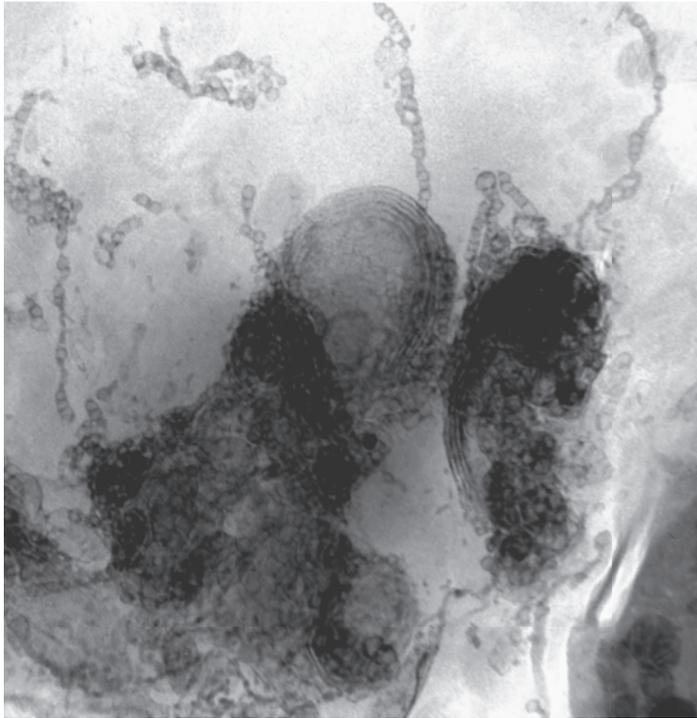


図 3

図 3 ラット小腸吸収上皮細胞, ZIO 染色で染色されたゴルジ装置. ここには規則正しく積み重なったゴルジスタック, 網状のゴルジ層板, ゴルジ装置に連続する小管構造を認めることができる. 1 μm 厚切片, 1000 kV.

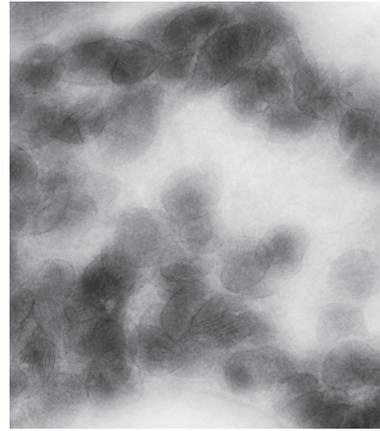


図 4

図 4 ラット胃壁細胞, Cytochrome Oxidase の酵素組織化学で染色されたミトコンドリア. 槽状のクリステに酵素活性をもつ球状のミトコンドリアが細胞内分泌細管をよけて分布する様子を認めることができる. 1 μm 厚切片, 1000 kV.

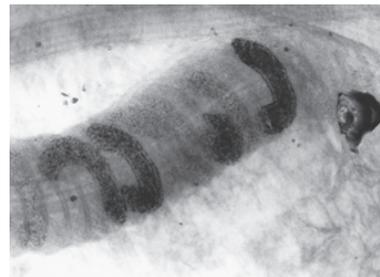


図 5

図 5 ラット精子, ZIO 染色で染色されたミトコンドリア. クリステ構造は明瞭ではないが, 中間部の複数の小型ミトコンドリアが軸糸に螺旋状に巻き付いている様子を認めることができる. 1 μm 厚切片, 1000 kV.

のように小胞体内腔に存在する可溶性蛋白の多くは核膜内腔にも同様に分布する (図 1). このような染色では核膜の凹凸や曲面の状態, 小胞体との連絡などが認められ, 核膜孔は反応産物のぬけた部分として認められる.

#### 4.2 小胞体, 小管構造

上に述べたように, 小胞体内腔と核膜内腔とは連続していると考えられるので小胞体の前述の calreticulin などの可溶性蛋白に対する抗体を用いて酵素抗体法で染色すれば小胞体の広がり把握できる. またゴルジ装置やシナプス小胞を染めることのできる ZIO 染色でも小胞体内腔を核膜内腔と共に染色できる場合がある (図 2). ステロイド分泌細胞では網状滑面小胞体が脂肪滴を取り囲んでいる. 筋小胞体も ZIO 染色や硝酸銀を用いた古典的な染色法により明瞭に描出される.

#### 4.3 ゴルジ装置

ゴルジ装置は袋状の層板が一定間隔で積み重なっている部分をゴルジスタックとよび, 周囲の網状構造や小胞体までを含める. この細胞小器官はその複雑な三次元構造を超高圧電子顕微鏡で追求するのに恰好の対象である. このゴルジスタックを形成する層板には極性があり, 分泌面と形成面, あるいはトランス (trans) 側, シス (cis) 側と区別する. その両者は形態像では同じような層板でありながら, 含まれる蛋白, 糖, 脂質などの分布が異なっているため, 1つの染色方法で

ゴルジ装置全体が染色されることはまれである.

##### トランス側

ゴルジ装置のトランス面の形状は細胞の種類や分泌活動状態によってかなり変化する様に思われる. 酵素組織化学による AcPase の反応産物がこの部分の内腔に分布することを利用して, その形状を観察すると, 小管からなる網状な構造をしていることがある<sup>5)</sup>.

##### シス側

シス側でもゴルジスタックの層板は穴の少ない層板の積み重ねであるのに対して, シス側最外層の層板はスタックにぴったり寄り添いながらも, 多数の穴を持った, 網状の層板である. オスミウムによる染色<sup>1)</sup>や ZIO 染色<sup>2)</sup>では全体としてシス側を中心に染色され, 特に最外層の層板が高電子密度に染色される傾向があるが, 理由は不明である. この網状構造はゴルジ周辺の小管がシス側最外層に移行しながら, 編み込まれて形成されると考えられている<sup>6)</sup> (図 3).

##### 全体像

ゴルジ装置の全体像は細胞の種類によってかなりの違いがある. 小腸の円柱上皮細胞では核上部に上下に開いた円筒形, その他の分泌細胞では 10 μm を超えるかなり巨大な球状, 或いは楕円体様空間を取り囲んでいる<sup>1,7,8)</sup>. 通常, ゴルジ装置として超薄切片像で認識されるゴルジ装置は連続したゴル

ジスタックが形成する巨大な網状構造の一部にすぎない。同様所見は超高压電子顕微鏡による厚切り連続切片による観察<sup>1,9)</sup>や、高分解能走査電子顕微鏡によるゴルジ装置の観察<sup>10)</sup>によっても同様の所見が得られている。

#### 4.4 ミトコンドリア

ミトコンドリアは cytochrome oxidase の酵素組織化学によって特にクリステの外区画部分に高電子密度の反応産物が集中する。ZIO 法では内区画に高電子密度の反応産物が観察される。ミトコンドリア全体の大きさ、形状、クリステの形状も細胞の種類によってさまざまである。小腸上皮では超薄切片像では数  $\mu\text{m}$  程度に観察されたものが、厚切り切片内では立体的な連続性が保たれ、10 数  $\mu\text{m}$  にまで連続したミトコンドリアが観察されることもある。胃壁細胞やステロイドホルモン分泌細胞では球形の(図4)、そして神経細胞や精子などでは比較的小型のミトコンドリアが観察される。特に精子の中間部に集中するミトコンドリアは小型で全体に螺旋状に巻き付いている様子が立体的に捉えることができる(図5)。

#### 4.5 ライソゾーム

酵素組織化学的 AcPase の反応産物の分布をもとに食作用の盛んなマクロファージのライソゾームの分布を見た研究では様々な刺激でヒモ状に伸びたネマトライソゾーム(nematolysosome)が生ずる様子が超高压電子顕微鏡で捉えられている<sup>11)</sup>。しかし、このネマトライソゾームは食作用のある細胞にのみ認められるわけではなく、分泌細胞では細胞の中心体から放射状にネマトライソゾームのネットワークが微小管に沿って広がっていることも観察されている<sup>12)</sup>。

#### 4.6 ペロキシゾーム

ペロキシゾームは特に肝、腎の組織に多く分布し、通常、球形の形状をしている。ペロキシゾームにはカタラーゼが含まれるため、この酵素を酵素組織化学的に検出することにより、高電子密度に染め出すことができる。特に、肝では Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) の投与でペロキシゾームの増加とそれに伴う立体構造の変化が観察されている<sup>13)</sup>。

### 5. 超高压電子顕微鏡像を机の上でじっくり観察する

通常、超高压電子顕微鏡の場合、厚切り切片観察が多いので、特に理由がなければ、ステレオ写真を撮影しておくべきである。切片のステレオ像はゴニオメーターを用いて切片を傾斜させて撮影された2枚の写真を並べて、裸眼あるいはステレオスコープで観察するものなので、実際の観察時にはそのステレオ観察はできない。ステレオ写真を観察することにより、切片に含まれる構造の立体感が強調され、得られる情報も多い。ステレオ写真の他に、より広い範囲を高分解能で観察するための組み写真、より巨大な構造を捉えるための厚切り連続切片観察、ゴニオメーターの機能をフル活用して作成するトモグラフィ像など、超高压電子顕微鏡を用いた細胞や組織の観察は事後になされることが多い。

### 6. あとがき

医学、生物学に携わる研究者のみならず、多くの細胞に興味を持つ人々は細胞内の三次元構造をそのまま実感してみたいという願望を潜在的に持っていると思う。この願望の表れは多くの教科書、科学雑誌等のメディアに登場する「細胞の立体像」であるが、それらは不完全であったり、正確でないことが多い。このことは細胞小器官の三次元構造に関する研究が医学、生物学の研究者の間にも充分知られていないためかと思われる。真実に近い細胞や細胞小器官の三次元構造、立体的細胞内分布等は医学、生物学において最も基本的な情報の1つであり、これまで、そのような研究成果は超高压電子顕微鏡や高分解能走査電子顕微鏡<sup>14)</sup>によって得られてきたものである。このような形態学的研究がさらに進歩し、その成果が多くの細胞の構造と機能に興味を抱く人々に受け入れられることを望む。

### 謝 辞

本稿に掲載した超高压電子顕微鏡写真はすべて、自然科学機構、生理学研究所、脳形態計測室の H1250M を使用し、撮影されたものである。御指導いただいた有井達夫准教授に感謝致します。

### 文 献

- 1) Friend, D.S. and Murray, M.J.: *Am. J. Anat.*, 117, 135-150 (1965)
- 2) Noda, T. and Ogawa, K.: *Acta Histochem. Cytochem.*, 17, 435-451 (1984)
- 3) Chan-Palay, V. and Palay, S.L.: *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.*, 137, 125-152 (1972)
- 4) 野田 亨: 日本組織細胞化学会(編), 組織細胞化学 1996, 学際企画, 東京, 1996, p. 65-72
- 5) Mayahara, H. and Chang, J.P.: *Acta Histochem. Cytochem.*, 11, 239-251 (1978)
- 6) Noda, T. and Ogawa, K.: *Acta Histochem. Cytochem.*, 21, 343-364 (1988)
- 7) Rambourg, A. and Clermont, Y.: *Eur. J. Cell Biol.*, 51, 189-200 (1990)
- 8) 野田 亨, 小川和朗: 細胞, 20, 376-381 (1988)
- 9) 野田 亨, 小川和朗: 細胞, 17, 542-547 (1985)
- 10) Tanaka, K., Mitsushima, A., Fukudome, H. and Kashima, Y.: *J. Submicrosc.*, 18, 1-9 (1986)
- 11) Sakai, M., Araki, N. and Ogawa, K.: *J. Electron Microsc. Tech.*, 12, 101-131 (1989)
- 12) Araki, N., Ohno, J., Lee, T., Takashima, Y. and Ogawa, K.: *Exp. Cell Res.*, 204, 181-191 (1993)
- 13) Nagata, T.: *Micron*, 32, 387-404 (2001)
- 14) 田中敬一: 超ミクロ世界への挑戦, 岩波書店, 東京, 1989, p. 109-145