

高圧凍結技法による胃粘膜の 超微形態研究

Ultrastructural Study of Gastric Mucosa by Using High-pressure Freezing Technique

澤口 朗, 豊嶋 典世
Akira Sawaguchi and Fumiyo Toyoshima

宮崎大学医学部解剖学講座超微形態科学分野

要旨 高圧凍結技法は金属圧着法に代表される従来の凍結技法をはるかに凌ぐ深い硝子様凍結が得られ、形態保持と物質保存性に優れた魅力的な凍結技法として注目されている。筆者らの研究室では1994年に高圧凍結装置を導入して以来、胃粘膜の超微形態研究を軸に医学生物学研究への応用に取り組んできた。読者がそれぞれの研究課題へ応用を検討する材料となるよう、これまでの研究成果を紹介する。

キーワード：高圧凍結技法，胃粘膜，超微形態，組織化学

1. はじめに

形態保持と物質保存性に優れた凍結技法は、形態観察ならびに組織化学的解析の最初のステップとしてさらに重要性を増している。その中でも、2,100 bars (=210 MPa) の高圧下では氷晶形成と成長が抑制されるという原理に基づく高圧凍結技法は、金属圧着法に代表される従来の凍結技法をはるかに凌ぐ深い硝子様凍結が得られる魅力的な凍結技法として注目されている^{1,2)}。筆者らの研究室では1994年にBAL-TEC社製高圧凍結装置HPM010を導入して以来、試料キャリア等の改良や培養細胞の高圧凍結技法の開発を進めながら医学生物学研究への応用に取り組んできた。本稿では、読者が各研究領域への応用を検討される材料として、筆者らが主題として推し進めてきた「高圧凍結技法による胃粘膜の超微形態研究」に関する成果を紹介する。

2. ラット胃粘膜の高圧凍結試料作製法

生体ラットから胃粘膜を採取して高圧凍結を施す場合、麻酔下で胃粘膜の一部を採取し、試料ホルダー(図1A)内部に装填するリング状の試料キャリア(図1B, C)の内径(2 mm)に合わせて素早く細切する。試料が試料キャリアの厚さ

(300 μm)より薄すぎるとキャリア内に空気が混入して凍結不良をきたし、逆に厚すぎると試料が圧迫されて形態が崩れる為、筆者らはプラスチックフィルムを二枚のカミソリ刃の間に挟んで刃の間隔を300 μmに調整した二枚刃を使用している³⁾。また、標準品として市販されている厚さ200 μmのアルミニウム製試料キャリアは熱伝導性に優れるが強度に難があり、高圧負荷により試料キャリアが変形して胃粘膜がつぶれることが少なくなかった。そこで、筆者らは強度に優れる僅か10 μm厚のステンレス箔と試料保持リングを組み合わせて考案した方法により、試料の圧損もなく(図1D)、硝子様凍結が凍結面からの深度で50~100 μmに達する良好な凍結を安定して得られている⁴⁾。

高圧凍結後は直ちに試料を液体窒素に移し、形態観察用試料は2%四酸化オスミウム/アセトン溶液、組織化学用試料は0.5%グルタルアルデヒド/アセトン溶液を用いて凍結置換を施し、それぞれEpoxy系樹脂、Lowicryl系樹脂に包埋して薄切する。

3. 胃漿液・粘液流動動態に関する電顕組織化学的研究

胃に食物が入ると胃粘膜を構成する胃底腺から消化酵素を含む漿液や胃酸が分泌されて消化が促進される一方、これらの攻撃因子から胃粘膜を保護する粘液が分泌されるが、細胞から分泌された漿液や粘液が胃粘膜表層に達する流動動態については未解明のままであった。それは従来の化学固定法による試料作製では組織の収縮や脱水操作によって胃底腺腔内の漿液や粘液が失われて解析できないことが主因であったが、ラット胃底腺の高圧凍結試料では胃底腺腔内に分泌された漿液や粘液の形態が保持されていることが組織化学的観察によって明らかとなった⁵⁾。さらにLowicryl K4Mに包埋して薄切した切片を0.1%過マンガン酸カリウムで1分間、酸化処理してからウラン鉛染色を施すことで、漿液を高電子密度に染め出して「可視化」することに成功した⁶⁾(図2A)。

腺腔内に分泌された漿液と粘液の流動動態を解明するため、副細胞型粘液と特異的に結合する*Griffonia simplicifolia Agglutinin* (GSA)-II レクチンを用いた金コロイド標識と前述の染色法を併用して観察を進めた結果、胃底腺底部で分泌された漿液が頸部から分泌された副細胞型粘液との間に界面を保持した状態で腺腔内を上昇し(図2B)、胃小窩部に到達すると界面が解消して漿液と副細胞型粘液が一筋の流路を形成して胃粘膜を覆う粘液ゲル層へ向かうことが明らかとなった(図2C)。粘液ゲル層の層状構造については光顕レベルの組織化学染色で既に報告されていたが⁷⁾、それを裏付けるように漿液成分の存在によって高電子密度を呈する副細胞型粘液と電子密度の低い表層粘液細胞型粘液が交互に複数の層を形成することが確認された(図2D)。

以上の研究成果は、生体の形態保持や物質保存性に加え、細胞や組織を瞬時に固定する高圧凍結技法が形態観察の時間分解能にも優れることを示すもので、従来の化学固定法では

〒889-1692 宮崎県宮崎市清武町木原 5200
TEL: 0985-85-1784; FAX: 0985-85-8406
* E-mail: sawa@fc.miyazaki-u.ac.jp
2010年3月5日受付

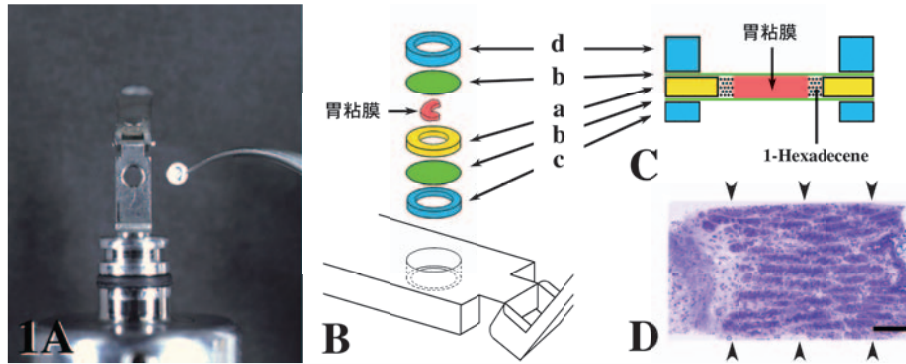


図1 高圧凍結装置 (BAL-TEC HPM010) の試料ホルダー (A) 内部に胃粘膜と試料キャリア (外径 3 mm) を装填する概略図 (B) とその断面図 (C). a; 試料キャリア (厚さ 300 μm), b; 試料保護ステンレス箔製円板 (厚さ 10 μm), c; スペースリング I (厚さ 300 μm), d; スペースリング II (厚さ 500 μm). (D) ラット胃粘膜の準超薄切片トルイジンブルー染色像. 矢頭は試料保護ステンレス箔製円板 (b) に面した冷却面を示す. Bar = 50 μm .

解明し得なかった胃漿液・粘液流動動態の詳細な検討が可能となった具体例として参考にされたい。

4. 胃酸分泌刺激に伴う壁細胞の超微形態変化に関する研究

胃酸分泌に与る胃底腺壁細胞は、空腹時の酸分泌休止期には酸分泌を担うプロトンポンプを有する細管小胞が細胞内に貯留する形態を示す一方、摂食刺激を受けて酸分泌活動期に入ると細管小胞膜が頂上膜と融合してプロトンポンプの局在が頂上膜へ移行すると考えられている^{8,9)} (図 3A)。しかし、2つの膜が融合する瞬間を捉えた決定的な観察報告はなく、前述の「膜融合仮説」は未だ「仮説」の域を越えていない。

筆者らは新たなアプローチとして、ウサギの胃底腺から採取した初代培養壁細胞に高圧凍結を施した 300 nm 厚の切片をもとに、Tecnai TF30 (FEI 社) を用いて約 3 nm 間隔のトモグラムを作成し、IMOD software で三次元立体再構築した (図 3B, C)。その結果、ヒスタミン刺激によって頂上膜の直下に細管小胞が集まり、一部が頂上膜に向かって伸長する再構築像が得られた (図 3C)。胃酸分泌機構解明の鍵を握る膜融合の決定的な形態学的所見を捉えるべく、更なる解析を加えていきたい。

5. 胃酸分泌後回復期の壁細胞膜動態に関する超微形態研究

前述の胃底腺壁細胞は摂食後の酸分泌活動期と食間の休止期を繰り返すが、このうち休止期から酸分泌活動期へ移行する際の膜動態については、初代培養壁細胞や単離胃底腺などの実験モデルが確立され、数多くの知見が集められてきた。しかし、酸分泌活動期から休止期への回復過程にある壁細胞の膜動態については再現性の高い実験モデルがなく、未だ不明な点が多い。近年、筆者らは生体の胃粘膜に近い組織形態を保ち、ヒスタミン等の試薬に速やかな反応性を示す「ラット単離胃粘膜モデル」を開発し³⁾、その応用研究によって再現性の高い“酸分泌後回復期”壁細胞実験モデル確立に成功した¹⁰⁾。

この実験モデルを用いて、抗プロトンポンプ抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った結果、酸分泌後回復期におけるプロトンポンプの局在が頂上膜から細胞内へ経時的に移行することが明らかとなった (図 4A)。これを裏付けるように、高圧凍結技法を用いた超微形態観察の結果、酸分泌活動期に発達した頂上膜が酸分泌後回復期 60 分後あたりから細胞内に取り込まれ (図 4B)、同 90 分後にはオートファゴソーム様の多重膜構造 (図 4C) を形成しながら次の酸分泌刺激に備えた休止期に戻ることが示唆された。今後はさらに詳細な超微形態観察を加えると共に、その所見に基づいた分子生物学的解析を加えることによって、胃酸分泌機構の解明が進むものと期待される。

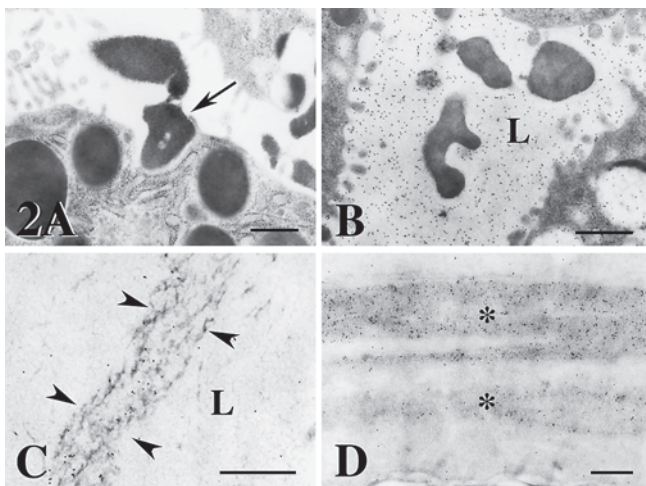


図2 高圧凍結技法によるラット胃粘膜の漿液・粘液流動動態観察像。(A) 胃底腺底部。過マンガン酸カリウム酸化反応を応用した漿液成分可視化染色法による主細胞酵素原顆粒の開口分泌像 (矢印)。(B-D) 副細胞型粘液と特異的に結合するGSA-II レクチンを用いた金コロイド標識と漿液成分可視化染色法を併用。(B) 胃底腺頸部。副細胞型粘液が占める腺腔 (L) を漿液成分が界面を保持した状態で表層へ上昇。(C) 胃小窩部。漿液成分と副細胞型粘液の界面が解消し、両者が一筋の流路 (矢頭) を形成して表層へ向かう。(D) 胃粘膜表面を覆う粘液ゲル層。漿液成分と副細胞型粘液が電子密度の高い層 (*) を形成。Bars = 0.5 μm 。

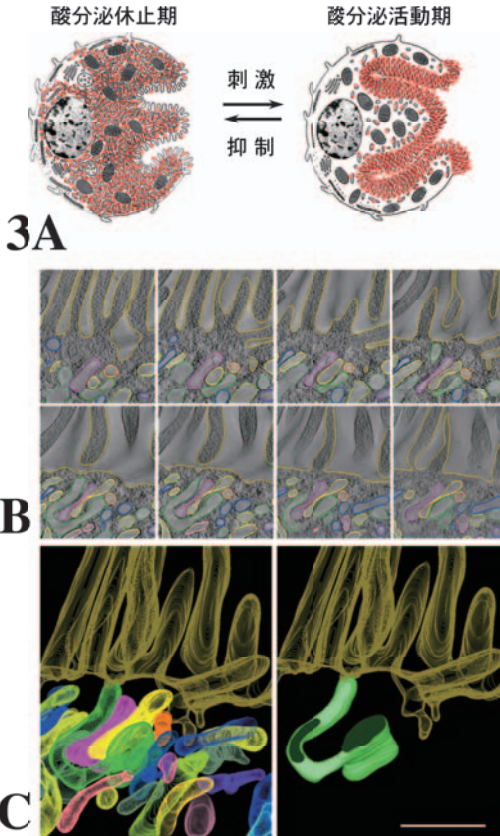


図3 (A) 酸分泌休止期と活動期における胃底腺壁細胞の形態変化を示す模式図。酸分泌刺激を受けると休止期に貯留していた細管小胞膜が頂上膜に融合し、プロトンポンプが細胞表面に露呈される。(B) ウサギ初代培養壁細胞にヒスタミンによる酸分泌刺激を加えて10分後に高圧凍結を施した観察試料のトモグラム像。300 nm厚の切片から約3 nm間隔の断面を作成し、IMOD softwareを用いて頂上膜と細管小胞膜をトレースした連続シリーズより抜粋。(C) (B)の三次元立体再構築像。右図に抽出した細管小胞(緑)の一部が頂上膜に向かって伸長。Bar = 0.5 μm 。

6. おわりに

胃粘膜の超微形態研究をもとに高圧凍結技法がもたらす優れた超微形態ならびに生体物質の保存性を紹介した。近年、生体組織や培養細胞、酵母などの観察対象に応じた高圧凍結技法の改良が進み、観察方法に応じた凍結試料の加工法も種々、開発されている¹¹⁾。本稿をきっかけに読者の各研究課題に高圧凍結技法が応用され、その利点から得られる新知見によってまた新たな研究が展開されることを期待してやまない。

本研究はカリフォルニア大学バークレー校のJohn G. Forte教授ならびにKent L. McDonald 研究員、コロラド大学ボルダー校のMary K. Morpew 研究員との共同研究であり、ここに謝意を表します。

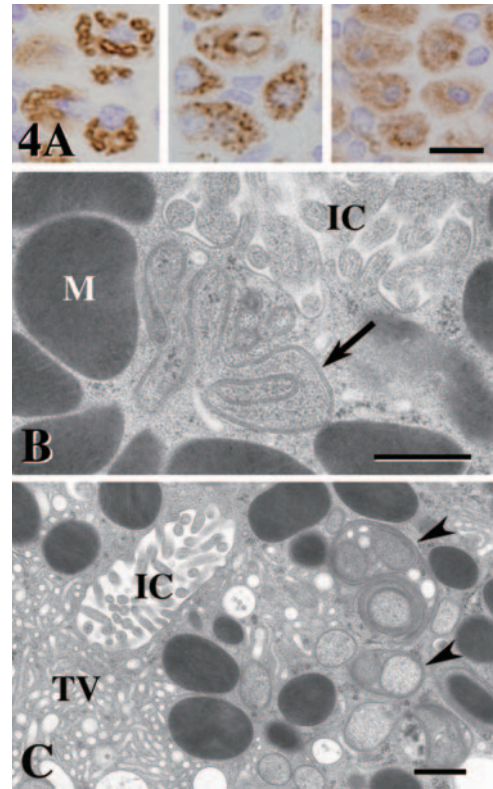


図4 ラット単離胃粘膜モデルを応用した酸分泌後回復期壁細胞の動態観察。(A) 抗プロトンポンプ抗体による免疫組織化学像。回復期5分後(左)に分泌細管の頂上膜に集積していた強陽性反応が、同60分後(中)には分泌細管が狭小化して反応も減弱。さらに同120分後(右)には細胞内に瀰漫性の陽性反応を認める。(B) 回復期60分後に分泌細管(IC)の頂上膜付近で観察された膜取り込み像(矢印)。M;ミトコンドリア。(C) 回復期90分後に観察された多重膜構造(矢頭)と、次の分泌刺激に備えるように再び貯留しはじめた細管小胞(TV)。Bars = 10 μm (A), 0.5 μm (B, C)。

文 献

- 1) Dahl, R. and Staehelin, L.A.: *J. Electron Microsc. Tech.*, 13, 165-174 (1989)
- 2) McDonald, K.: *Methods. Mol. Biol.*, 117, 77-97 (1999)
- 3) Sawaguchi, A., Aoyama, F., Ide, S. and Suganuma, T.: *Arch. Histol. Cytol.*, 68, 151-160 (2005)
- 4) Sawaguchi, A., Ide, S. and Suganuma, T.: *J. Electron Microsc.*, 54, 143-146 (2005)
- 5) Sawaguchi, A., Ishihara, K., Kawano, J., Oinuma, T., Hotta, K. and Suganuma, T.: *J. Histochem. Cytochem.*, 50, 223-234 (2002)
- 6) Sawaguchi, A., Ide, S., Kawano, J., Nagaike, R., Oinuma, T., Tojo, H., Okamoto, M. and Suganuma, T.: *Arch. Histol. Cytol.*, 62, 447-458 (1999)
- 7) Ohta, H. and Katsuyama, T.: *Histochem. J.*, 24, 86-92 (1992)
- 8) Forte, T.M., Machen, T.E. and Forte, J.G.: *Gastroenterology*, 73, 941-955 (1977)
- 9) Yao, X. and Forte, J.G.: *Annu. Rev. Physiol.*, 65, 103-131 (2003)
- 10) Sawaguchi, A., Aoyama, F., Ohashi, M., Ide, S. and Suganuma, T.: *J. Electron Microsc.*, 55, 97-105 (2006)
- 11) McDonald, K.L., Morpew, M., Verkade, P. and Müller-Reichert, T.: *Methods Mol. Biol.*, 369, 143-173 (2007)