

細胞内小器官の直接3D観察

課題番号 10670017

平成10年度～平成12年度科学研究費補助金基盤研究(C)(2)研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 洲崎 悦子
(広島大学医学部講師)

細胞内小器官の直接3D観察

課題番号 10670017

平成10年度～平成12年度科学研究費補助金基盤研究(C)(2)研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 洲崎 悦子
(広島大学医学部講師)

はしがき

私達は先に共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた細胞内小器官レベルでの三次元構造解析を行ってきた。今回、平成10年度から12年度まで科学研究補助金（基盤研究(C)(2)）「細胞内小器官の直接3D観察」（課題番号10670017）の配分を受けることによって、接眼レンズで覗く顕微鏡視野の中に3D像が浮かび上がる観察装置「3Dヘッド」を購入することができ、直接3D観察を進めることができたことに、心よりお礼申し上げます。この観察法は、共焦点レーザー走査顕微鏡をはじめとする3D観察法の中で最も簡便で安価であり、今後の普及が期待される。研究期間の終了に際し、3D観察に興味をもっている多くのユーザーやこの領域の研究者の参考に供するため、その成果を総括して報告する。

研究組織

研究代表者： 洲 崎 悦 子 （広島大学医学部講師）
研究分担者： 片 岡 勝 子 （広島大学医学部教授）

研究経費

平成10年度	2,800千円
平成11年度	200千円
平成12年度	300千円

計	3,300千円
---	---------

研究発表

(ア)学会誌等

1. Louis Yuge, Masao Yamamoto, Seiichi Kawamata and Katsuko Kataoka: Immunocytochemical localization of connexin 43 and E-cadherin in I-407 cells mediated by cAMP. *Acta Histochem. Cytochem.* 31: 427-433, 1998.
2. 片岡勝子: 胃粘膜上皮の幹細胞と細胞分化. *生体の科学* 49: 207-212, 1998.
3. 洲崎悦子, 片岡勝子: ゴルジ装置の三次元構造. *バイオイメージング* 7: 179-180, 1998.
4. 片岡勝子: 胃腸粘膜の組織形成と細胞間結合. *バイオメカニズム学会誌* 23: 199-202, 1999.
5. Etsuko Suzaki and Katsuko Kataoka: Three-dimensional visualization of the Golgi apparatus: Observation of Brunner's gland cells by a confocal laser scanning microscope. *J. Struct. Biol.* 128: 131-138, 1999.
6. Louis Yuge and Katsuko Kataoka: Differentiation of myoblasts is accelerated in culture in a magnetic field. *In Vitro Cell Dev. Biol.—Animal* 36: 383-386, 2000.
7. Takafumi Ito, Noriaki Yorioka, Masao Yamamoto, Katsuko Kataoka and Michio Yamakido: Effect of glucose on intercellular junctions of cultured human peritoneal mesothelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 1969-1979, 2000.
8. 洲崎悦子, 姜暁艶, 片岡勝子: 組織切片におけるゴルジ装置と微小管の三次元観察. *バイオイメージング* 9: 140-141, 2000.
9. 片岡勝子: 細胞更新の超微形態: 胃粘膜の表層粘液細胞. *細胞* 32: 289-293, 2000.
10. 片岡勝子: 胃腸粘膜の発生. *生態の科学* 52: 61-66, 2001.
11. Katsuko Kataoka, Etsuko Suzaki and Kazuhide Komura: The Golgi apparatus of goblet cells in the mouse descending colon: Three-dimensional visualization using a confocal laser scanning microscope. 「発表予定」

(イ)口頭発表

1. 片岡勝子, 洲崎悦子, 古村一秀: ゴルジ装置の三次元構造—レクチン細胞化学と共焦点レーザー顕微鏡による解析—. 第24回広島ホルモン・トランスミッター研究会, 1998年6月13

日，広島。

2. Katsuko Kataoka, Etsuko Suzaki and Kazuhide Komura: The Golgi apparatus of mucus-secreting cells in the mouse intestine: Three-dimensional visualization using a confocal laser scanning microscope. Fifth Joint Meeting Japan Society for Histochemistry and Cytochemistry and the Histochemical Society, July 23-26, 1998, San Diego.
3. 片岡勝子，洲崎悦子：腸の粘液分泌細胞のゴルジ装置—糖蛋白の形成部位と三次元構造の解析—。日本電子顕微鏡学会関西支部平成10年度特別講演会，1998年7月31日，大阪。
4. Etsuko Suzaki and Katsuko Kataoka: Three-dimensional structure of the Golgi apparatus: A lectin cytochemical study on mouse Brunner's gland cells. Third Congress of the Asian-Pacific Organization for Cell Biology, August 24-28, 1998, Osaka.
5. Katsuko Kataoka, Etsuko Suzaki and Kazuhide Komura: Three-dimensional structure of the Golgi apparatus: A lectin cytochemical study on goblet cells of the mouse distal colon. Third Congress of the Asian-Pacific Organization for Cell Biology, August 24-28, 1998, Osaka.
6. Etsuko Suzaki and Katsuko Kataoka: Three-dimensional structure of the Golgi apparatus: A confocal laser scanning microscopic analysis on lectin-stained Brunner's gland cells of ICR mice. The Golgi complex: State of the Art 100 years after Camillo Golgi's Discovery, September 19-23, 1998, Pavia.
7. 洲崎悦子，片岡勝子：ゴルジ装置の三次元構造。第7回日本バイオイメーキング学会学術集会，1998年10月20-21日，浜松。
8. 洲崎悦子，片岡勝子，古村一秀，姜暎艶：立体視：いろいろな三次元観察。第53回日本解剖学会中国四国地方会，1998年11月14-15日，徳島。
9. 古村一秀，洲崎悦子，片岡勝子：マウス大腸における粘液細胞のレクチン結合性。第53回日本解剖学会中国四国地方会，1998年11月14-15日，徳島。
10. 洲崎悦子，寺川進：好中球の開口放出。日本過酸化脂質・フリーラジカル学会第22回大会，1998年11月20-21日，神戸。
11. 片岡勝子：杯細胞ゴルジ装置の三次元構造解析：レクチン組織化学と共焦点レーザー走査顕

微鏡 (CLSM) によるマウス遠位結腸の観察. 第 30 回日本臨床電子顕微鏡学会, 1998 年 11 月, 東京.

12. 洲崎悦子, 古村一秀, 片岡勝子: ゴルジ装置の三次元解析: マウス十二指腸腺細胞と下行結腸の杯細胞におけるレクチン細胞化学的観察. 第 104 回日本解剖学会全国学術集会, 1999 年 3 月 29-31 日, 三鷹.
13. 姜暁艶, 洲崎悦子, 片岡勝子: ゴルジ装置の三次元解析: マウス胃体の外分泌細胞における観察. 第 104 回日本解剖学会全国学術集会, 1999 年 3 月 29-31 日, 三鷹.
14. 古村一秀, 洲崎悦子, 片岡勝子: マウス大腸の杯細胞におけるレクチン結合性. 第 104 回日本解剖学会全国学術集会, 1999 年 3 月 29-31 日, 三鷹.
15. 片岡勝子, 洲崎悦子: レクチン組織化学を使ったゴルジ装置における glycosylation の解析と、その共焦点レーザー顕微鏡への応用. 第 104 回日本解剖学会全国学術集会, 1999 年 3 月 29-31 日, 三鷹.
16. Katsuko Kataoka, Etsuko Suzaki, Kazuhide Komura and Jiang Xiaoyan: Three-dimensional structure of the Golgi apparatus in gastrointestinal exocrine cells. XV Congress of I. F. A. A., July, 1999, Rome.
17. 洲崎悦子, 姜暁艶, 片岡勝子: 組織切片における微小管の免疫組織化学的染色の試み. 第 54 回日本解剖学会中国四国地方会, 1999 年 11 月 13-14 日, 広島.
18. 片岡勝子: 胃腺におけるペプシノーゲン分泌細胞の成熟: 分泌装置の微細形態学および細胞化学的観察. 第 31 回日本臨床電子顕微鏡学会, 1999 年 11 月 17-19 日, 東京.
19. 洲崎悦子, 片岡勝子: ゴルジ装置と細胞骨格. 第 40 回日本組織細胞化学会, 1999 年 12 月 6-7 日, 京都.
20. 片岡勝子, 洲崎悦子: ペプシノーゲン分泌細胞の成熟: マウス固有胃腺の副細胞から主細胞への転換に関する組織化学的観察. 第 40 回日本組織細胞化学会, 1999 年 12 月 6-7 日, 京都.
21. 洲崎悦子, 姜暁艶, 片岡勝子: パラフィン切片における微小管の三次元観察—特にゴルジ装置との関係. 第 105 回日本解剖学会全国学術集会, 2000 年 3 月 29-31 日, 横浜.
22. Etsuko Suzaki, Jiang Xiaoyan and Katsuko Kataoka: Three-dimensional visualization of

microtubules: Improvement of the staining method and their relation to the Golgi apparatus. XV International Symposium on Morphological Sciences, September, 2000, Kyoto.

23. 片岡勝子, 洲崎悦子: パラフィン切片における微細管の免疫組織化学的染色の試み. 第32回日本臨床電子顕微鏡学会, 2000年9月28-30日, 北九州.
24. 洲崎悦子, 姜暎艶, 片岡勝子: 組織切片におけるゴルジ装置と微小管の三次元観察. 第9回日本バイオイメージング学会学術集会, 2000年11月9-10日, 東京.
25. 姜暎艶, 洲崎悦子, 片岡勝子: 塩酸分泌の形態学的解析. 第55回日本解剖学会中国四国地方会, 2000年11月11-12日, 鳥取.
26. 片岡勝子, 洲崎悦子: 胃腺壁細胞の分泌装置に関する立体形態学的解析: 塩酸分泌との関係. 第41回日本組織細胞化学会, 2000年12月7-8日, 高知.
27. 洲崎悦子, 片岡勝子: VEC-DIC 顕微システムを用いた好中球の phagocytosis-exocytosis 過程の動態解析. 第106回日本解剖学会全国学術集会, 2001年4月2-4日, 高知. 「発表予定」
28. 姜暎艶, 洲崎悦子, 片岡勝子: ラット胃粘膜の壁細胞: 塩酸分泌に関係する形態学的変化. 第106回日本解剖学会全国学術集会, 2001年4月2-4日, 高知. 「発表予定」
29. 永野克人, 洲崎悦子, 片岡勝子, 梶原博毅: 筋線維タイプにおけるカテプシンD量の比較. 第106回日本解剖学会全国学術集会, 2001年4月2-4日, 高知. 「発表予定」

研究成果

[はじめに]

私達は先に共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた細胞内小器官レベルでの三次元構造解析を行ってきた。特に細胞内分泌装置の中心的役割を担うとされるゴルジ装置の立体構造を明らかにすることを試み、消化管の外分泌細胞のゴルジ装置はドーム状の構造をもつことを明らかにした。今回、平成10年度から12年度まで科学研究補助金（基盤研究(C)(2)）「細胞内小器官の直接3D観察」（課題番号10670017）の配分を受けることによって、直接3D観察法の一つである反射型高倍率3D観察法(proceedings RMS 32: 87-101, 1997)に基づく観察装置「3Dヘッド」(UHI システムズ)を購入し、顕微鏡標本の立体観察を進めることができた。この観察法は、表1にも示したとおり3D観察法の中でおそらく最も簡便で安価であり、レーザーといった特殊な光源もコンピューターも必要とせず、単に従来の落射蛍光顕微鏡に装着するだけで接眼レンズで覗く顕微鏡視野の中に3D像が浮かび上がるという方法である。

表1 2つの3D観察法の比較

3D観察法の種類	共焦点レーザー走査顕微鏡	3Dヘッドによる直接3D観察法
価格	高価(3000万円前後)	安価(約270万円)
3D像の構成	コンピューター処理による再構築	顕微鏡視野の中に3D像が見える
取り扱い	操作を習得する必要あり	簡便

共焦点レーザー走査顕微鏡による観察は、高倍率でかつ詳細を観察することが可能であるが、そのために観察できる細胞がかなり限られてしまうという難点があった。そこで、この直接3D観察法を導入することにより、比較的広範囲に組織・細胞を立体観察しながら、必要に応じて共焦点レーザー走査顕微鏡による詳細な観察を進めていった。

さらに平成11年度には、一般的な蛍光色である黄緑色と赤色の二色の蛍光を同時に観察できるダブルダイクロイック・フィルターを装備し、黄緑色または赤色の単色蛍光の観察だけではなく、二重染色を行った標本の同時二色三次元観察を行うことも可能となった。

[材料と方法]

(1) 細胞内分泌装置やそれを支持する細胞骨格である微小管の染色

マウスの雄性成獣から十二指腸近位部を摘出し、ホルマリン固定の後、通常法に従ってパラフィン切片を作製した。切片には、目的に応じてレクチン組織化学的染色または免疫蛍光染色を行った。前者の場合は蛍光標識レクチンによる直接法を用いた。後者の場合は2ステップの間接法で行い、2次抗体には近年紹介された新しい蛍光色素である Alexa で標識されたものを用いた。特に微小管染色を目的とする場合には、固定液に微小管安定化剤である Taxol を加え、染色分子の浸透をよくするため on section で collagenase 処理(0.04 mg/ml, 37°C, 30 min)を行った。

(2) 胃の壁細胞における塩酸分泌に関与した構造の染色

ラットの雄性成獣を用い、無処理群、ガストリン投与による塩酸分泌促進群、H₂-blocker のラニチジン投与による塩酸分泌抑制群それぞれから、胃体の同じ部位を摘出し、ブアン固定の後、通常法に従ってパラフィン切片を作製した。各群からの切片に、塩酸を分泌している本体である

プロトン・ポンプに対する抗体を用いた免疫蛍光染色を施した。また、細胞内エネルギー代謝に関与する小器官であるミトコンドリアとの二重染色も試みた。

(3) 3D観察

上記(1)(2)のいずれも、まず直接3D観察法にて組織の広い範囲を立体観察した。そして、さらに詳細で高倍率な観察を必要とする場合に、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた。

[結果と考察]

直接3D顕微鏡を用いて観察を行った場合、用いる標本の厚さと対物レンズとの組み合わせにもよるが、4~6 μ m厚の切片を蛍光染色した標本をx100倍の対物レンズ(N.A. 1.3, oil)で観察したところ、この厚さの組織切片に存在する個々の細胞のもつ立体感やその中にある小器官の空間的配置を実感でき、通常の顕微鏡では得ることのできない立体的な像を得られる有用性の高い観察法であることが明らかとなった。従って、薄切されたパラフィン切片を用いて十分な3D観察を行うことが可能であり、また、比較的厚めに薄切する凍結切片などではより効果の高い3D観察も可能であると考えられる。観察結果の例を図1-3に示す。

ダブルダイクロイック・フィルターを用いた同時二色三次元観察も試みた。直接3D顕微鏡で観察した例を図4に、同じ標本を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した例を図5に示す。共焦点レーザー走査顕微鏡ではズームをかけた観察が容易にできるので図5に示されるように細部までよくわかるが、分解能そのものはこれに劣らない高分解能な像が図4においても得られていることから、直接3D観察法は簡便・安価で優れた立体観察法であると評価できる。さらに高倍率な観察例として、共焦点レーザー走査顕微鏡で得られた像を図6(約1100倍)に示した。ここでは、細胞内小器官の中でも小さい構造であるミトコンドリアが、塩酸分泌に関わる細胞内分泌細管に近接して分布するという局在がとらえられている。この例のような高倍率が必要な場合は、現状では共焦点レーザー走査顕微鏡が格段に優れているといえよう。また、像の記録方式がデジタルであることも直接3D観察法にない利点といえる。

3年間の研究成果は先に示したように随所で発表してきたが、以下に要点と今後に期待できる点を簡潔にまとめる。

(1)直接3D顕微鏡の評価：直接3D顕微鏡は、顕微鏡標本を立体視できる簡便で安価な装置である。特に優れた点として、接眼レンズで覗いた視野内に3D像が見えるという簡便さと、広視野を短時間で3D観察できることがあげられる。高倍率・高分解能であるが、対物レンズの性能を超えて倍率を上げることは現状では困難である。しかし、共焦点レーザー走査顕微鏡との併用により効率のよい三次元観察が可能であり、逆に、共焦点レーザー走査顕微鏡単独では発揮できない性能を、直接3D顕微鏡はもっているといえる。

(2)上皮細胞の分泌装置とそれを支える細胞骨格：上皮組織を構成している細胞での微小管染色は困難とされてきた。今回、固定液にTaxolを加える、on sectionでcollagenase処理を行い染色分子の浸透をよくする、退色しにくい蛍光色素Alexaを使用する、という改良を加えることにより、上皮細胞での微小管染色に成功した。これによって、上皮細胞内でのゴルジ装置を中心とした分泌装置とそれを支える細胞骨格である微小管との関係を三次元的に明らかにすることができ

た。さらに、微小管形成中心(MTOC)が細胞のどこにあり微小管がどのような配向で細胞内に分布するかは、現在1つの国際的トピックスであり、MTOCと関連した γ -tubulin染色の結果から、ゴルジ装置辺縁部や3つの細胞の連結部に γ -tubulin または γ -tubulin 様タンパク質の存在が示唆される結果が得られ、今後の期待される成果と考える。

(3) 胃の壁細胞における塩酸分泌に関連した構造: 胃の壁細胞において塩酸分泌に関連した構造として、分泌刺激を受けた時に発達する細胞内分泌細管や、分泌休止期に発達する小管小胞構造に対応する構造を、プロトン・ポンプに対する抗体を用いた免疫蛍光染色によって光顕的レベルでとらえることができた。これによって、胃粘膜にある腺の頂部から底部にまで広く分布する壁細胞を、腺全体に渡って分泌状態と関連してどのように分泌構造が変化するかを定量的に解析することができた。その結果、分泌反応性は腺上部の壁細胞で高く、低部では低いこと、また、胃内pHとよく対応したプロトン・ポンプの染色パターンが示されることがわかった。また、細胞内エネルギー代謝に関与する小器官であるミトコンドリアとの二重染色を試みた結果、発達した分泌細管を取り囲むようにミトコンドリアが集合して配置しており、このことはエネルギー依存的にプロトンを排出するための効率的局在であると考えられた。

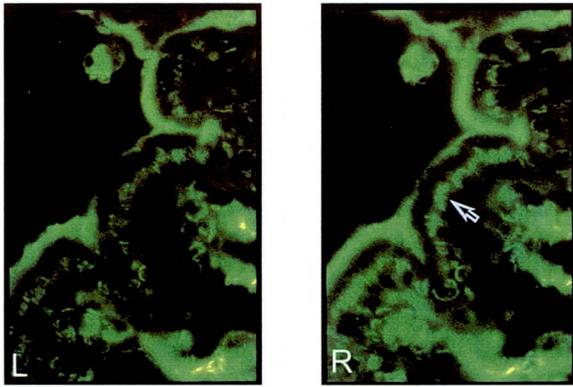


図1 マウス胃の表層粘液細胞における
ゴルジ装置のステレオ・ペア像

表層粘液細胞のゴルジ装置を蛍光標識
レクチン(HPA)で染色した像。核上部にド
ーム状のゴルジ装置が並んで観察される
(矢印)。L:左眼像 R:右眼像

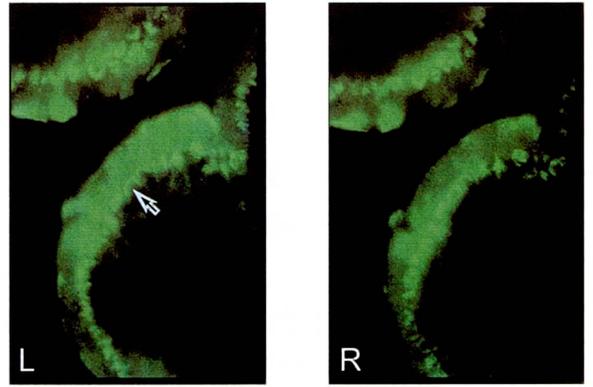


図2 マウス十二指腸の吸収上皮細胞に
おける γ -tubulin染色のステレオ・ペア像

ゴルジ装置の辺縁に相当する構造が抗
 γ -tubulin抗体(polyclonal抗体, Sigma)
によって染色されている(矢印)。L:左眼像
R:右眼像

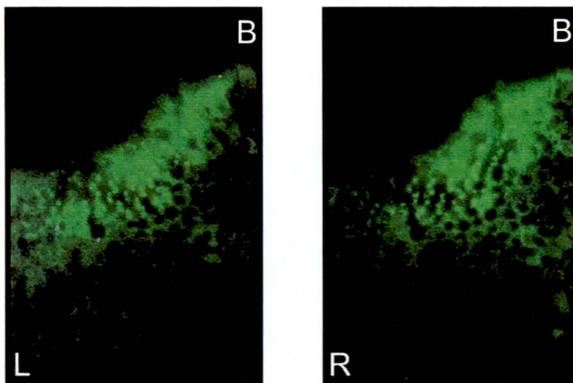
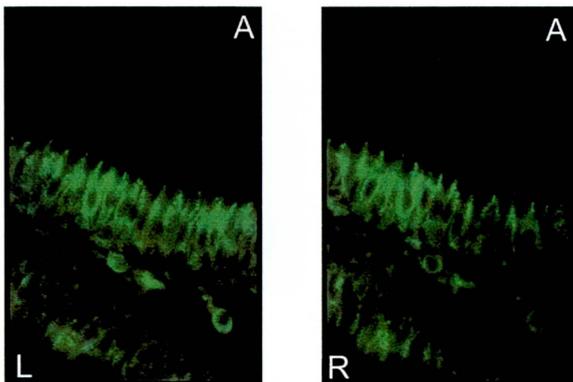


図3 マウス十二指腸の吸収上皮細胞における
 γ -tubulin染色のステレオ・ペア像

3つの細胞の会合細胞間結合部が抗 γ -
tubulin抗体(monoclonal抗体, 分裂期酵母を
用いて作製された抗体)によって染色されて
いることがわかる。Aのペア:縦断像 Bのペア:
横断像 L:左眼像 R:右眼

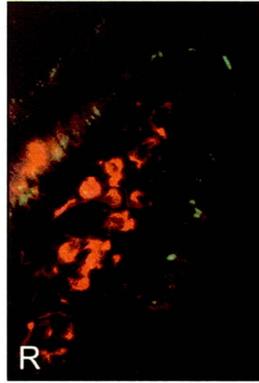
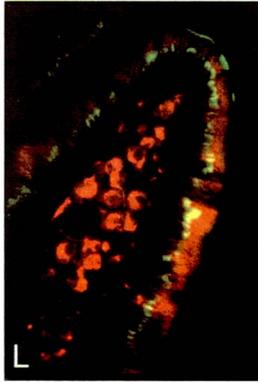


図4 マウス十二指腸絨毛における γ -tubulinと α -tubulinとの二重染色のステレオ・ペア像
 γ -tubulinが黄緑色に、 α -tubulinが赤く染色されている。図2の単染色で示されるように、吸収上皮細胞のゴルジ装置にあたる構造が抗 γ -tubulin抗体で染色され、それを貫くように細胞の長軸に沿って多数の微小管(α -tubulin)の線維状染色が観察される。また、絨毛の内部に存在する結合組織性の細胞ではMTOCを中心とした放射状微小管アレイが観察される。L:左眼像
 R:右眼像

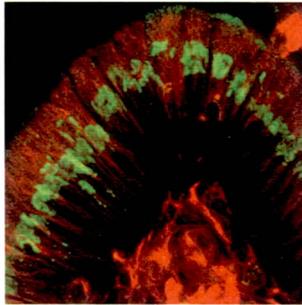


図5 マウス十二指腸絨毛における γ -tubulinと α -tubulinとの二重染色像
 図4と同じ染色標本を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した像。

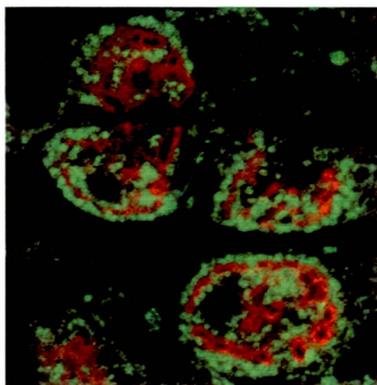


図6 ラット胃粘膜上部の壁細胞におけるミトコンドリアとプロトン・ポンプの二重染色像
 ミトコンドリアが緑色に、プロトン・ポンプが赤く染色されている。共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した像。