

1. 凍結割断法 (freeze cracking method) による生物試料の観察 (第1報)

ライフサイエンス研究所

古河 恵一 (実験動物室)

堀内 喜高 小宮 久尚 (電顕室)

生物試料の凍結割断法 (freeze cracking method) は、走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscopy: SEM) の発達と臨界点乾燥法 (critical point drying method) の発明により、細胞の表面並びに内部の構造を観察するのに有用であり、割断法として種々の方法が確立されている。今回、水溶性包埋剤の (Dimethyl sulfoxide; DMSO) を用いて、Rat の腎臓を観察した。

方 法

Wistar 系 Rat の雄、体重 200~250g をネンブタール麻酔下で腎動脈から、2.5% Glutaraldehyde (0.1M cacodylate buffer pH 7.4) による灌流固定を行った。組織片を 12.5%, 25%, 50%, の DMSO に浸漬して、液体窒素による凍結割断後、1% O_3O_4 で後固定を施し、アルコール系列の脱水、酢酸イソアミルで置換、臨界点乾燥を行い、イオンコーターにて Au 蒸着をして、日立 S-450 加速電圧 20Kv で観察した。

結果及び考察

腎臓の全体を凍結割断すると、その symmetry 像では皮質、髓質、糸球体、糸球体のう、近位曲尿細管、遠位曲尿細管、ヘンレの係蹄、集合管、弓状動静脈などが明確に観察された。

糸球体の表面構造は、毛細血管、podocyte、が見られ、特に podocyte は核を囲んでいる所

が盛り上がり、数本の突起を伸ばし枝分かれして終足を両側に出している。時として終足同志が連絡しており、橋渡し (bridge structure) の状態が見られる。糸球体を割断すると、毛細血管の断面が観察され、その内皮細胞に径 500~1000Å の小孔が無数に開き、窓あき型 (有窓型) を呈している。また内皮細胞の核周囲から放散する細胞質稜によって仕切られている。毛細血管外面に podocyte の突起が付着して、底部はわずかに平らに広がっている。

糸球体のうの断面では尿管極と血管極が観察され、parietal layer 表面に尿管極では微絨毛と線毛が、血管極では線毛を認めその線毛は丁度、多角形の輪郭をふちどる様な形態を保っているのが特徴的である。

近位曲尿細管の断面は細胞の丈が高く、円い核、刷子縁の密集 (微絨毛の層)、微絨毛の基部には pinocytotic vesicles が見られる。

遠位曲尿細管の断面は管径が細く、細胞の丈も低い。微絨毛が低くまばらで、著名な基底陥入、ミトコンドリアが並んでいる。

cortical collecting tubule では、光顕像で見られる dark cells (microvilli and micropliae) と light cells (few short microvilli) が観察された。また macula densa と思われる遠位曲尿細管の断面も見られた。

この凍結割断法は目的とする場所を crack することが可能であり、特に実質臓器の内部構造を検索するのに適していると思われる。

今後更に検討して histo-pathological な方面の利用をも考えている。